

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

der Veterinärmedizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

**Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten aus landwirtschaftlichen
Biogasanlagen des Freistaates Sachsen: Auswahl und Etablierung von
bakteriologischen und molekularbiologischen Verfahren zum Nachweis
ausgewählter Indikatorkeime**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Janina Marta Lucia Pospiech

aus Eckernförde

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Gerhard Breves, Physiologisches Institut, Stiftung Tierärztliche
Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 20.10.2015

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literatur	3
2.1	Gesetzliche Grundlagen	3
2.2	Grundlagen der Biogasproduktion	9
2.2.1	Möglichkeiten zur Hygienisierung von Gärsubstraten und Gärresten	10
2.3	Hygienische Aspekte beim Einsatz von Gärresten aus Biogasanlagen	11
2.3.1	Bakteriologische Risiken	11
2.3.2	Parasitäre Risiken	13
2.3.3	Virale Risiken	14
2.3.4	Phytohygienische Risiken	15
2.4	Beschreibung der ausgewählten Indikatororganismen	16
2.4.1	<i>Clostridium perfringens</i>	16
2.4.2	<i>Clostridium botulinum</i>	17
2.4.3	Fäkalstreptokokken	18
2.4.4	<i>Escherichia coli</i>	19
2.4.5	<i>Salmonella</i> spp.	20
2.4.6	Extended-Spectrum β -Lactamase-bildende Bakterien (ESBL)	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Bakterien	22
3.1.2	Nährmedien sowie deren Bestandteile	23
3.1.3	Biochemische Identifizierungssysteme	25
3.1.4	Chemikalien und Reagenzien	25
3.1.5	Geräte	25
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Charakteristik der verwendeten Nährmedien	27
3.2.2	Etablierung und Standardisierung der kulturell-mikrobiologischen Nachweismethoden (qualitativ und quantitativ) mit definierten Keimzahlen	31
3.2.2.1	Herstellung einer Testkeimsuspension	33
3.2.2.2	Berechnung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter	33
3.2.2.3	Aufbereitung der Matrix „Gärrest“	33
3.2.3	Probitanalyse	34
3.2.4	Überprüfung der ausgewählten Nährmedien an Gärresten und Gärsubstraten aus Biogasanlagen im Freistaat Sachsen	35
3.2.4.1	Beschreibung der Pilotbetriebe	35
3.2.4.2	Probenentnahme, Transport, Lagerung	36

3.2.4.3	Bakteriologische Untersuchung der Gärreste und Gärsubstrate	37
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von <i>C. perfringens</i> und <i>C. botulinum</i>	39
3.2.5.1	Aufbereitung der Proben für die PCR.....	40
3.2.5.2	Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> Toxin-Genen	40
3.2.5.3	Nachweis von <i>Clostridium botulinum</i>	43
3.2.5.4	Gelelektrophorese.....	47
3.2.6	Molekularbiologische Untersuchung der Gärreste und Gärsubstrate	48
3.2.6.1	Aufbereitung der Proben	48
3.2.6.2	Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> Toxin-Genen	49
3.2.6.3	Nachweis von toxinbildenden <i>Clostridium botulinum</i>	49
4	Ergebnisse	49
4.1	Auswahl von Nährmedien für die bakteriologische Untersuchung von Gärresten	49
4.1.1	Qualitätskontrolle der ausgewählten Fertignährböden	49
4.1.2	Quantitativer Nachweis von Bakterien aus beimpfter Matrix.....	50
4.1.2.1	Herstellung einer Testkeimsuspension	50
4.1.2.2	Vergleich von Brilliance™ Salmonella Agar, XLD Agar und XLT4 Agar	51
4.1.2.3	Vergleich Slanetz Bartley Agar und Enterococcus Selektivagar	52
4.1.2.4	Vergleich von Tergitol 7 Lactose TTC Agar und Brilliance™ E. coli/Coliform Selektiv Agar	53
4.1.2.5	Brilliance™ ESBL Agar	53
4.1.2.6	Vergleich von Membran Clostridium Perfringens Selektivnährboden und TSC Agar.....	55
4.2	Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von <i>C. perfringens</i> und <i>C. botulinum</i>	57
4.2.1	Aufbereitung der Proben	57
4.2.1.1	Aufreinigung von DNA aus grampositiven Bakterien.....	57
4.2.1.2	Aufreinigung von DNA aus Rückstellproben (nativer Gärrest, Gärsubstrate)	57
4.2.1.3	Aufreinigung von DNA aus Anreicherungen in TPYG-Bouillon	57
4.2.2	<i>Clostridium perfringens</i> Toxin-Gen PCR.....	57
4.2.3	<i>Clostridium botulinum</i> Toxin-Gen PCR.....	59
4.3	Bakteriologische Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten aus Biogasanlagen.....	62
4.3.1	Einfluss der Matrix auf die Auswertung der Agarplatten	62
4.3.2	Nachweis der Indikatororganismen in Gärresten und Gärsubstraten aus Biogasanlagen	65
4.3.2.1	Pilotbetrieb 2.....	65
4.3.2.2	Pilotbetrieb 3.....	66
4.3.2.3	Pilotbetrieb 4.....	67

4.3.2.4	Pilotbetrieb 5.....	68
4.3.2.5	Pilotbetrieb 6.....	69
4.3.2.6	Pilotbetrieb 7.....	70
4.3.2.7	Pilotbetrieb 8.....	71
4.3.2.8	Pilotbetrieb 9a.....	72
4.3.2.9	Pilotbetrieb 9b.....	74
4.3.2.10	Pilotbetrieb 10.....	75
4.3.3	Bestimmung des Toxintyps der <i>C. perfringens</i> Feldisolate mittels PCR	76
4.3.4	Untersuchung der Rückstellproben und Anreicherungen in TPYG-Bouillon auf <i>C. perfringens</i> mittels PCR	80
4.3.5	<i>Clostridium botulinum</i> PCR	83
5	Diskussion	85
5.1	Beurteilung der verwendeten Methoden für den Nachweis von Bakterien aus Gärresten und Gärsubstraten	85
5.2	Bakteriologische Beurteilung der untersuchten Proben aus Biogasanlagen.....	92
6	Zusammenfassung	97
7	Summary.....	99
8	Literaturverzeichnis	101
9	Anhang	112
9.1	Aufbereitung der Proben für die PCR	112
9.1.1	Aufbereitung der Proben für die Etablierung und Standardisierung	112
9.1.2	Aufbereitung der Gärreste und Gärsubstrate zur molekularbiologischen Untersuchung.....	113
9.1.2.1	Aufreinigung von DNA aus Rückstellproben	113
9.1.2.2	Aufreinigung von DNA aus TPYG-Bouillon	114
9.2	Probitanalyse.....	116
9.3	<i>Clostridium botulinum</i> Neurotoxin-Gen PCR	124
9.4	<i>Clostridium botulinum</i> NTNH-Gen PCR	132
	Tabellenverzeichnis	135
	Abbildungsverzeichnis.....	136

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
§	Paragraph
§§	Paragrafen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Aqua dest.	Aqua destillata
Art.	Artikel
ATCC	American Type Culture Collection
BfR	Bundesamt für Risikobewertung
BGA	Biogasanlage
BGBL. I	Bundesgesetzblatt Teil I
BioAbfV	Bioabfallverordnung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
ca.	circa
CEN	Europäisches Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation)
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

DüMV	Düngemittelverordnung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ESBL	Extended Spectrum beta-Lactamase
et al.	und andere
EU	Europäische Union
f.	folgender
ff.	folgende
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.
FuE	Forschung und Entwicklung
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	hour(s) = Stunde(n)
i. d. F.	in der Fassung
i.d.R.	in der Regel
IMB	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
IZW	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
KTBL	Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V.
l	Liter
LfULG	Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie
LKZ	Lebendkeimzahl
mCP	Membrane Clostridium Perfringens
min	Minuten
ml	Milliliter

NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NCTC	National Collection of Type Cultures
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt(e)
PB	Pilotbetrieb
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RKI	Robert Koch-Institut
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
s.	siehe
sp.	Spezies/Art
spp.	mehrere Spezies/Arten
STEC	Shiga Toxin produzierende <i>E. coli</i>
subsp.	Subspezies (Unterart)
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TierNebG	Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz
TierNebV	Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung
TPGY	Trypticase Peptone Glucose Yeast (Tryptikase Pepton Glukose Hefe)
TSC	Tryptose-Sulfit-Cycloserin
u.a.	unter anderem
V	Volt
VO	Verordnung
VTEC	Vero Toxin produzierende <i>E. coli</i>
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat
XLT4	Xylose-Lactose-Tergitol 4
z.B.	zum Beispiel

1 **Einleitung**

Bei der vorgelegten Arbeit handelt es sich um einen Projektabschnitt eines FuE-Projektes, das durch das Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie gefördert wurde (Az.: 24-4331/286/2, Vergabe-Nr. B 211). Dieser Abschnitt beinhaltet die Etablierung von bakteriologischen und molekularbiologischen Nachweismethoden für ausgewählte Indikatororganismen in Gärresten sowie die Einschätzung des Risikopotentials von Gärresten aus Biogasanlagen des Freistaates Sachsen.

Im Freistaat Sachsen waren Ende 2013 nach Erhebungen des Landesamts für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (LfULG) Sachsen rund 260 Biogasanlagen in Betrieb, wovon ca. 220 an landwirtschaftliche Betriebe angeschlossen sind. Im Zuge der Biogasproduktion fallen Gärreste an, die als Wirtschaftsdünger auf die Felder aufgebracht werden können. Über das Futter für die Nutztiere oder die Düngung von Pflanzen für den menschlichen Verzehr können sie auch in die Nahrungsmittelkette des Menschen gelangen. Biogasanlagenbetreiber sehen sich zunehmend mit Akzeptanzproblemen in der Bevölkerung konfrontiert. Ursache hierfür ist unter anderem die Angst vor krankheitserregenden Bakterien in den Gärresten. Vor allem eine mögliche, nicht beabsichtigte, Massenvermehrung bzw. Anreicherung von Bakterien der Gattung *Clostridium* (WEILAND et al. 2007), insbesondere das Neurotoxin-bildende *Clostridium botulinum*, wurde in der Öffentlichkeit und den Medien intensiv diskutiert. In diesen Diskussionen werden meist die gesetzlichen Grundlagen (siehe 2.2), die den Schutz der Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt gewährleisten sollen und für Biogasanlagen sowie Gärreste gelten, außer Acht gelassen. Mittlerweile gibt es diverse Studien, die bestätigen, dass von Gärresten aus Biogasanlagen kein erhöhtes Risiko ausgeht, und dass der Biogasprozess keimreduzierend wirkt (u.a. BAGGE et al. 2005; WATCHARASUKARN et al. 2009; LEBUHN und WILDERER 2006; BAGGE et al. 2010; BREVES 2012 und 2014). Das Keimspektrum der Gärreste ist i. d. R. abhängig von dem Keimgehalt der Gärsubstrate, die in die Biogasanlagen eingespeist werden (BREVES 2012; LEBUHN und FRÖSCHLE 2012). Werden Substrate mit einem erhöhten Gehalt an pathogenen Bakterien in eine Biogasanlage eingetragen, kann die keimreduzierende Wirkung der zumeist mesophilen Vergärung unter Umständen nicht ausreichend sein, so dass der Gärrest als belastet angesehen werden muss (FACHVERBAND BIOGAS e.V. 2014). Daher sieht der Gesetzgeber vor, dass Substrate, so sie ein erhöhtes seuchenhygienisches Risikopotential aufweisen (z.B. Speisereste oder Schlachtabfälle sowie Biotonneninhalte), nur nach gesetzlich vorgegebener Behandlung (ANON. 2009b) oder in speziell dafür zugelassenen Abfallvergärungsanlagen zur Biogaserzeugung eingesetzt werden dürfen (FACHVERBAND BIOGAS e.V. 2014). Gibt es keine gesetzlichen Vorgaben für eine hygienisierende Behandlung von Gärresten oder Gärsubstraten, wie es zum Beispiel bei

Gärresten, die vom eigenen Betrieb stammen und zur Düngung auf das eigene Feld aufgebracht werden, der Fall ist (ANON. 2007a), kann eine mikrobiologische Untersuchung sicher stellen, dass die Düngung mit diesen Gärresten kein Risiko für die Gesundheit von Mensch und Tier darstellt. Ein Ziel der hier vorgelegten Arbeit war daher die Etablierung von bakteriologischen und molekularbiologischen Nachweismethoden für ausgewählte Indikatororganismen aus Gärresten von Biogasanlagen des Freistaates Sachsen. Des Weiteren wurde die Praxistauglichkeit der Nachweismethoden an Feldproben getestet. Hierfür wurden Feldproben von zehn Biogasanlagen des Freistaates Sachsen untersucht und ihr Risikopotential bewertet.

2 Literatur

2.1 Gesetzliche Grundlagen

In Deutschland sind die hygienischen Anforderungen an Wirtschaftsdünger und Gärreste gesetzlich festgelegt. Diese gewährleisten den Schutz der Gesundheit von Menschen, Tieren, Pflanzen und der Natur. In diesem Abschnitt sind ausgewählte gesetzliche Grundlagen zusammengefasst, die hygienische und seuchenhygienische Vorgaben enthalten. Wichtig für den Geltungsbereich dieser Grundlagen ist dabei u.a., welche Eingangssubstrate verwendet werden und ob die Gärreste auf eigenen Flächen ausgebracht oder an Dritte weiter gegeben werden. Im Folgenden werden im Besonderen die hygienischen Anforderungen, die für die Gesundheit von Mensch und Tier von Relevanz sind, aufgeführt.

Düngegesetz

Das "Düngegesetz vom 9. Januar 2009 (BGBl. I S. 54, 136), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 15. März 2012 (BGBl. I S. 481) geändert worden ist, setzt Rechtsakte der Europäischen Union um, bzw. sorgt für deren Durchführung insbesondere bezüglich des Inverkehrbringens oder der Anwendung von Düngemitteln (ANON. 2009a). Zweck des Gesetzes ist es laut § 1 Nummer (Nr.) 3 „Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren sowie für den Naturhaushalt vorzubeugen“, die durch Düngemittel entstehen können.

Düngeverordnung

Die „Düngeverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 27. Februar 2007 (BGBl. I S. 221), die zuletzt durch Artikel (Art.) 5 Absatz (Abs.) 36 des Gesetzes vom 24. Februar 2012 (BGBl. I S. 112) geändert worden ist“ regelt die „gute fachliche Praxis bei der Anwendung von Düngemitteln, [...] auf landwirtschaftlich genutzten Flächen“ (ANON. 2007a). Dieses umfasst u.a. Begriffsbestimmungen, Grundsätze für die Anwendung, Anwendungsbeschränkungen und –verbote sowie Aufzeichnungspflichten.

Düngemittelverordnung – DüMV

Die "Düngemittelverordnung vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2482)" regelt das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (ANON. 2012).

Gemäß DüMV dürfen Düngemittel weder zugelassen (§ 3 Abs. 1 Nr. 1) noch in den Verkehr gebracht werden (§ 4 Abs. 1 Nr. 1), wenn von ihnen eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch, Tier und Nutzpflanzen ausgeht oder der Naturhaushalt gefährdet wird. Dieses setzt

laut § 5 Abs. 1 voraus, dass „keine Krankheitserreger, Toxine oder Schaderreger enthalten sind, von denen Gefahren für die Gesundheit von Menschen, Tieren und Nutzpflanzen ausgehen.“ Hinsichtlich seuchenhygienischer Eigenschaften heißt dies, die Anforderungen an die Seuchenhygiene gelten als eingehalten, wenn in 50 g Probenmaterial keine Salmonellen gefunden werden (§ 5 Abs. 2 Nr. 1). Die Voraussetzungen, wann abweichend hiervon die Anforderungen als eingehalten gelten, sind ebenfalls in § 5 festgelegt. „Hygienisierung“ definiert die DüMV als „Behandlung mit dem Ziel, die Konzentration an Krankheitserregern und Schadorganismen so weit zu reduzieren, dass das Risiko einer Verbreitung von Krankheiten der Menschen, der Tiere oder der Pflanzen sowie der Eintrag von Organismen mit unerwünschten Eigenschaften in die Umwelt vermindert wird. Die anaerobe Aufbereitung ist hier als Hygienisierungsverfahren erwähnt.

Bioabfallverordnung – BioAbfV

Die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden ist in der "Bioabfallverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. April 2013 (BGBl. I S. 658)" festgesetzt (ANON. 2013a). Im Sinne dieser Verordnung sind Bioabfälle: „Abfälle tierischer oder pflanzlicher Herkunft [...], die durch Mikroorganismen, bodenbürtige Lebewesen oder Enzyme abgebaut werden können, einschließlich Abfälle zur Verwertung mit hohem organischen Anteil tierischer oder pflanzlicher Herkunft [...]“ (§ 2 Nr. 1). Tierische Nebenprodukte sind von dieser Verordnung ausgenommen. Sie unterliegen der Verordnung (EG) 1069/2009 (ANON. 2009b) sowie dem Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (ANON. 2004a). Werden tierische Nebenprodukte gemeinsam mit Bioabfällen behandelt oder ein Gemisch aus beiden hergestellt und auf Böden aufgebracht, so gilt die BioAbfV zusätzlich zu den zuvor genannten Vorschriften (§ 1 Abs. 3 Nr. 3a). Die BioAbfV schreibt eine hygienisierende Behandlung von Bioabfall vor und definiert, dass bei einer Pasteurisierung das zuvor homogenisierte Material für mindestens eine Stunde auf 70°C erhitzt werden muss. Für die aerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Kompostierung) muss eine Temperatur von mindestens 55°C über einen möglichst zusammenhängenden Zeitraum von zwei Wochen einwirken während die anaerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Vergärung) erfordert, dass die Temperatur über den zusammenhängenden Zeitraum der Mindestverweilzeit im thermophilen Bereich (mind. 50°C) liegt. Die Mindestverweilzeit wird bei einer vorhergehenden Prozessprüfung ermittelt. Die hygienisierende Behandlung muss vor dem Ausbringen von Bioabfällen oder dem Herstellen von Gemischen erfolgen und seuchen- sowie phytohygienische Unbedenklichkeit gewährleisten (§ 3 Abs. 1). Angaben für die Prüfungen zur Seuchen- und Phytohygiene finden sich im Abs. 4 der BioAbfV. Der Bioabfallbehandler ist zur Überprüfung der Wirksamkeit seines Hygienisierungsverfahrens, sowie der Einhaltung des erforderlichen Temperatur-Zeit-Profiles mit Hilfe der Prozessüberwachung verpflichtet. Darüber hinaus hat

er die zulässigen Grenzwerte für Krankheitserreger, keimfähige Samen und austriebsfertige Pflanzenteile nach der hygienisierenden Behandlung einzuhalten.

In § 3b ist die Behandlung von Bioabfällen in Betrieben mit Nutztierhaltung definiert. Bioabfälle dürfen in diesen nur nach einer hygienisierenden Behandlung verbracht werden, es sei denn, die Nutztiere werden in abgetrennten Bereich gehalten, dann gilt dies nur für diese Bereiche. Eine hygienisierende und/oder biologisch stabilisierende Behandlung der Bioabfälle darf nur erfolgen, wenn sich z. B. die Biogasanlage in ausreichend weitem Abstand von der Nutztierhaltung befindet, um eine Übertragung von Seuchenerregern zu vermeiden. Der gesamte Betriebsbereich, in dem die Bioabfälle behandelt, gelagert oder abgegeben werden, muss vollständig von Tieren, Futtermitteln und Einstreu getrennt werden, so dass es keine Möglichkeit des Kontaktes, auch keinen unmittelbaren Kontakt, zwischen Tieren und Bioabfall tierischer Herkunft geben kann. Dies gilt auch, wenn zwei Betriebe aneinander angrenzen. In Anhang 1 sind die für eine Verwertung auf Flächen geeigneten Bioabfälle sowie die dafür geeigneten anderen Abfälle, biologisch abbaubaren Materialien und mineralischen Stoffe aufgelistet. Anhang 2 enthält, wie oben bereits beschrieben, die Anforderungen an die hygienisierende Behandlung von Bioabfällen zur Gewährleistung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit. Die Vorgaben zur Analytik, d.h. zur Probennahme, -vorbereitung und -untersuchung sind in Anhang 3 beschrieben.

Verordnung (EG) Nr. 1069/2009

Die „VERORDNUNG (EG) Nr. 1069/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 21. Oktober 2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte)“ wurde aus vielfältigen Gründen erlassen (ANON. 2009b). Unter anderem können nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier bergen. Darüber hinaus haben neue Technologien dafür gesorgt, dass tierische Nebenprodukte heutzutage die unterschiedlichsten Verwendungen finden, unter anderem auch in der Energieerzeugung. Die Nutzung dieser Technologien kann Gesundheitsrisiken mit sich bringen, die kontrolliert und minimiert werden müssen. Gülle und nicht mineralisierter Guano fallen unter diese Verordnung (Art. 2 Nr. 1 Buchstabe a). Abhängig von ihrem Grad der Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier werden tierische Nebenprodukte sowie ihre Folgeprodukte in dieser Verordnung (VO) in drei Kategorien eingeteilt (Artikel 7 – 10). In Kategorie 1 fallen unter anderem Tiere oder Körperteile von Tieren, die verdächtig auf Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE) sind, oder bei denen dies amtlich bestätigt wurde. Auch sogenanntes spezifiziertes Risikomaterial, also Material, durch das TSE übertragen werden könnte, fällt in diese Kategorie, sowie Speiseabfälle aus dem internationalen Verkehr (Art. 8). Auch Gemische, in denen Material der Kategorie 1

enthalten ist, müssen wie Kategorie 1 Material behandelt werden. Eine Verarbeitung ist nur durch Drucksterilisation erlaubt. Hierzu wird das Material auf eine Partikelgröße von max. 50 mm zerkleinert und bei einer Kerntemperatur von mindestens 133°C für mindestens 20 Minuten bei einem absoluten Druck von mindestens 3 bar sterilisiert.

Die Kategorie 2 umfasst unter anderem Gülle, nicht mineralisierten Guano sowie Magen- und Darminhalte und Tiere, die nicht durch Schlachtung oder Tötung zum menschlichen Verzehr zu Tode gekommen sind, einschließlich der Tiere, die im Zuge einer Seuchenbekämpfung getötet worden sind. Auch hier gelten Gemische aus Material der Kategorien 2 und 3 als Material der Kategorie 2 (Art. 9). Dieses Material kann zur Entsorgung verbrannt, aber auch zu Biogas umgewandelt werden, "mit oder ohne vorherige Verarbeitung, wenn es sich um Gülle, Magen und Darm und dessen Inhalt, Milch, Erzeugnisse auf Milchbasis, Kolostrum, Eier und Eiprodukte handelt, bei denen die zuständige Behörde nicht davon ausgeht, dass sie eine Gefahr der Verbreitung einer schweren übertragbaren Krankheit bergen" (Art. 13 Buchstabe e), ebenso wie Material von Wassertieren (Art. 13 Buchstabe g). Des Weiteren kann es ohne vorherige Verarbeitung auf Flächen ausgebracht werden, wenn es sich um „Gülle, von Magen und Darm getrennten Magen- und Darminhalt, Milch, Erzeugnisse auf Milchbasis und Kolostrum handelt, bei denen die zuständige Behörde nicht davon ausgeht, dass sie eine Gefahr der Verbreitung einer schweren übertragbaren Krankheit bergen" (Art. 13 Buchstabe f).

In Kategorie 3 gehören Schlachttiere, die zwar genusstauglich, aber aus kommerziellen Gründen nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt sind. Des Weiteren als schlachttauglich eingestufte Tiere oder Körperteile dieser Tiere, die bei der fleischhygienischen Untersuchung als genussuntauglich eingestuft werden, aber keine Anzeichen für auf Mensch und Tier übertragbare Krankheiten haben. Weiteres Material der Kategorie 3 ist in Art. 10 aufgeführt. Material der Kategorie 3 kann zur Biogasherstellung verwendet werden. Für Material der Kategorien 2 und 3 sind bei der Biogaserzeugung das unten beschriebene Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz und seine Durchführungsverordnung zu beachten

Verordnung (EU) Nr. 142/2011

Die „VERORDNUNG (EU) Nr. 142/2011 DER KOMMISSION vom 25. Februar 2011“ dient der “[...] Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren“ (ANON. 2011a). In dieser Verordnung sind u. a. Anforderungen an Biogasanlagen (Anhang V Kapitel I Abschnitt 1) aufgeführt und Vorgaben

für die Umwandlung von tierischen Nebenprodukten in Biogas bzw. für deren Kompostierung (Anhang V) enthalten. Befindet sich eine Biogasanlage auf einem Betrieb, auf dem auch Nutztiere gehalten werden, so muss eine vollständige räumliche Trennung von dem Bereich der Biogasanlage und dem Bereich der Nutztiere vorhanden sein. Es muss gewährleistet sein, dass kein unannehmbares Risiko einer Übertragung von einer Krankheit auf Mensch und Tier besteht. Besonders, wenn die Biogasanlage auch tierische Nebenprodukte verarbeitet, die nicht vom eigenen Betrieb stammen. Die Hygieneanforderungen (Anhang V Kapitel II) besagen, dass tierische Nebenprodukte nach ihrer Anlieferung ordnungsgemäß zu lagern und so schnell wie möglich zu verarbeiten sind. Des Weiteren sind regelmäßige Hygienekontrollen durchzuführen und eine Rekontamination der Fermentationsrückstände muss durch entsprechende Handhabung und Lagerung ausgeschlossen sein. Kapitel II Abschnitt 3 bestimmt Normen für Fermentationsrückstände und Kompost. Für die Überwachung des Verfahrens muss eine repräsentative Probe der Fermentationsrückstände oder eine Probe direkt nach der Umwandlung aus der Biogasanlage genommen und untersucht werden. Es müssen für *Escherichia coli* oder *Enterococcaceae* folgende Werte eingehalten werden: Bei 5 untersuchten Proben zu je 1 g müssen vier Proben eine Keimzahl von $\leq 10^3$ aufweisen, eine Probe darf eine Keimzahl zwischen 10^3 und 5×10^3 aufweisen. Eine repräsentative Probe der Fermentationsrückstände wird während oder unmittelbar nach dem Auslagern entnommen, um eine Untersuchung auf Salmonellen durchzuführen. Hier dürfen in 25 g keine Salmonellen nachweisbar sein. Werden diese Normen nicht eingehalten, muss im Falle einer nicht zufriedenstellenden Untersuchung auf *Escherichia coli* oder *Enterococcaceae* eine erneute Fermentation erfolgen, bei einem Nachweis von Salmonellen muss gemäß den Anweisungen der zuständigen Behörde gehandelt werden. Kapitel III des Anhanges V enthält Vorgaben für die Standard-Umwandlungsparameter für Biogasanlagen, die eine Pasteurisierungs- bzw. Entseuchungsabteilung vorgeschaltet haben. Diese betreffen die Partikelgröße (< 12 mm), die Mindesttemperatur (70°C im gesamten Material) sowie die Mindestverweildauer (60 min ohne Unterbrechung). Es sind zudem Alternativen möglich, die von der zuständigen Behörde zugelassen werden können. Der Antragsteller muss nachweisen, dass trotz abweichender Parameter eine ausreichende Reduktion der biologischen Risiken erfolgt. Dieses erfordert eine Validierung, deren Durchführung in Anhang V Kapitel III Abschnitt 2 aufgeführt ist. Bei thermischen und chemischen Verfahren muss eine Reduktion um 5 \log_{10} -Stufen von *Enterococcus faecalis* oder *Salmonella* Senftenberg (775W, H_2S negativ) und die Verminderung des Infektiositätstiters um 3 \log_{10} -Stufen eines thermoresistenten Virus (z.B. Parvovirus) nachgewiesen werden. Bei chemischen Verfahren muss zusätzlich die Verminderung resistenter Parasiten wie z.B. der Eier von *Ascaris* sp. um mindestens 3 \log_{10} -Stufen nachgewiesen werden (Anhang V Kapitel III Abschnitt 2 Nr. 1 Buchstabe d Ziffer i und ii).

Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung – TierNebV

Bei der "Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung vom 27. Juli 2006 (BGBl. I S. 1735), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 23. April 2012 (BGBl. I S. 611) geändert worden ist", handelt es sich um die Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes (ANON. 2004a; ANON. 2006).

Sie gilt laut § 1 für „den Umgang mit tierischen Nebenprodukten im Sinne des Artikels 2 Abs. 1 Buchstabe a der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (Amtsblatt EG Nr. L 273 S. 1) in der jeweils geltenden Fassung, einschließlich Küchen- und Speiseabfälle tierischer Herkunft im Sinne des Artikels 1 Abs. 2 Buchstabe e der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002.“ Teil 2 der TierNebV enthält die spezifischen Anforderungen an Küchen- und Speiseabfälle sowie an Betriebe mit Nutztierhaltung. In § 3 Abs. 2 Nr. 1 und 2 ist festgelegt, dass Küchen- oder Speiseabfälle, die in einer Biogasanlage auf einem Betrieb mit Nutztierhaltung verarbeitet werden, vor dem Befördern in den Betrieb pasteurisiert werden müssen, d. h. Material mit einer Teilchengröße von max. 12 mm muss für mindestens 60 Minuten bei einer Temperatur von mindestens 70°C erhitzt werden. Des Weiteren muss sich die Biogasanlage in einem ausreichend weiten Abstand von dem Bereich befinden, in dem die Tiere gehalten werden, um eine Seuchenübertragung zu verhindern. Gleiches gilt laut § 5 für sämtliche tierische Nebenprodukte, verarbeitete Erzeugnisse, etc., die sich auf einem Betrieb mit Nutztierhaltung befinden, es sei denn, es handelt sich um Gülle vom eigenen Betrieb. Befindet sich auf einem Betrieb mit Nutztieren eine Biogasanlage in der tierische Nebenprodukte, mit Ausnahme von Gülle, Milch und Kolostrum vom eigenen Betrieb, verarbeitet werden, so muss sich diese in einem ausreichend weiten Abstand von dem Bereich der Tierhaltung befinden und es darf keinen mittel- oder unmittelbaren Kontakt zwischen den Tieren und den tierischen Nebenprodukten sowie verarbeiteten Erzeugnissen geben, um eine Seuchenübertragung zu verhindern. Die Reinigung und Desinfektion der für den Transport der Fermentationsrückstände verwendeten Fahrzeuge und Behälter ist in § 8 festgesetzt. Sie muss nicht erfolgen, wenn die verwendeten Behälter, Fahrzeuge und Gerätschaft nicht mit unverarbeiteten tierischen Nebenprodukten in Berührung kommen oder Gülle befördert wird, die tiereseuchenrechtlich unbedenklich ist und nur Fermentationsrückstände zur Ausbringung auf die landwirtschaftlichen Flächen eines Betriebes transportiert werden. Werden in einer Biogasanlage Speise- und Küchenabfälle entweder ausschließlich oder zusammen mit Gülle eingesetzt, so muss zusätzlich zur Fermentation auch eine Pasteurisierung erfolgen. Bei Biogasanlagen, die ausschließlich Gülle, Mage- Darminhalt, Milch und Kolostrum als tierische Nebenprodukte einsetzen, ist dies nicht vorgeschrieben (§§ 13 bis 15).

Bei Anlagen, für die eine Pasteurisierung vorgeschrieben ist (§ 21 Abs. 1), muss die oben (VO (EU) Nr. 142/2011) bereits beschriebene Untersuchung auf *Escherichia coli* oder *Enterococcaceae* erfolgen. Eine Untersuchung von abgabefertigen Fermentationsrückständen auf Salmonellen ist bei den Biogasanlagen vorgeschrieben, die Speise- und Küchenabfälle entweder ausschließlich oder zusammen mit Gülle einsetzen (§ 21 Abs. 3). Werden fermentierte Gülle oder Gülleprodukte in den Verkehr gebracht, so ist eine Untersuchung auf *Escherichia coli* oder Enterokokken und auf Salmonellen vorgeschrieben. Es müssen dabei die Anforderungen der VO (EU) Nr. 142/2011 eingehalten werden (§ 21 Abs. 4, ANON. 2011a).

2.2 Grundlagen der Biogasproduktion

Der Biogasprozess ist ein mehrstufiger Prozess, dessen Teilschritte aufeinander aufbauen. Eine vereinfachte Darstellung der anaeroben Fermentation ist in Abbildung 1 zu sehen.

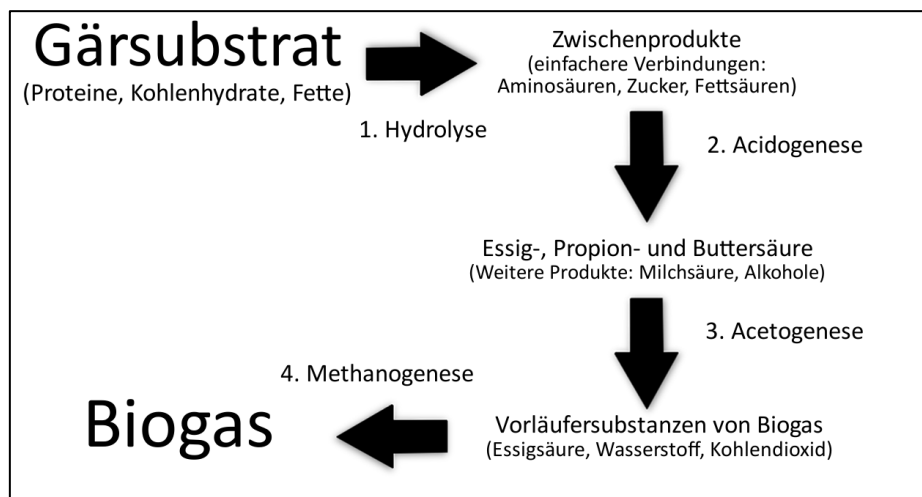


Abbildung 1: Schematische Darstellung der anaeroben Fermentation

Modifiziert nach Leitfaden Biogas (FNR 2010)

Der erste Schritt ist die Hydrolyse. Hier werden die komplexen Verbindungen der im Gärsubstrat enthaltenen Eiweiße, Fette und Kohlenhydrate in Aminosäuren, Fettsäuren, Mono- und Disaccharide gespalten (FRIEHE et al. 2010). Die hierzu erforderlichen Enzyme werden von fakultativ und obligat anaeroben Bakterien sezerniert, die sich physiologisch in hoher Anzahl im Kot unserer Nutztiere und somit auch im Substrat befinden (MAURER und WINKLER 1980; WANDREY und AIVASIDIS 1983). Da es sich bei der Hydrolyse um den langsamsten Schritt des Biogasprozesses handelt, ist diese maßgeblich verantwortlich für die Verweildauer der Substrate in der Biogasanlage (STAFFA 2003). Mit der zweiten Phase, der Acidogenese, startet die Fermentation. Es findet eine so genannte „Versäuerung“ statt, durch welche die Zwischenprodukte zu kurzkettigen Carbonsäuren wie u.a. Essig-, Propion- und Buttersäure sowie Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut werden (FRIEHE et al. 2010).

Des Weiteren werden auch geringe Mengen an Milchsäure und Alkoholen gebildet (STADLBAUER 1982; WANDREY und AIVASIDIS 1983). Der Wasserstoffpartialdruck beeinflusst die Effektivität dieses Schrittes. Bei steigendem Wasserstoffgehalt steigt die Menge der gebildeten Propion- und Buttersäure (STAFFA 2003). Die in dieser Phase beteiligten Bakterien sind fakultativ anaerob.

In der Acetogenese, dem dritten und Essigsäure bildenden Schritt, setzen acetogene Bakterien die entstandenen Produkte zu Vorläufersubstanzen des Biogases (Essigsäure, Wasserstoff, Kohlendioxid) um (FRIEHE et al. 2010). Damit Methan gebildet werden kann, stehen die acetogenen Bakterien in einer Symbiose mit methanogenen Archaeen, welche Wasserstoff und Kohlendioxid bei der Bildung von Methan verbrauchen, was Methanogenese genannt wird (WANDREY und AVASIDIS 1983). Diese vier Schritte laufen in einer landwirtschaftlichen Biogasanlage mit einstufigem Prozessverlauf zeitlich parallel ab, so dass durch die verschiedenen Ansprüche der Bakterien der einzelnen Stufen ein prozesstechnischer Kompromiss gefunden werden muss (FRIEHE et al. 2010). Unter anderem wird versucht, die Hydrolyse und die Acidogenese in zweistufiger Prozessweise von der Methanogenese räumlich zu trennen. Da trotz eines pH-Wertes von $<6,5$ in der Hydrolysestufe eine Methanbildung stattfinden kann und auch stattfindet, können die Schritte nur bedingt getrennt werden (OECHSNER und LEMMER 2009). Das Endprodukt dieses Prozesses ist das Biogas, als Reststoff fällt der Gärrest an.

2.2.1 Möglichkeiten zur Hygienisierung von Gärsubstraten und Gärresten

Die Hygienisierung von Gärsubstraten oder Gärresten kann, in Abhängigkeit vom Substrat, gesetzlich vorgeschrieben sein. Im Rahmen der rechtlichen Regelungen (siehe 2.1) sind die Verfahren beschrieben, mit denen eine Hygienisierung zu erfolgen hat. Im Folgenden sind einige dieser gesetzlich vorgeschriebenen Hygienisierungsverfahren kurz beschrieben.

Drucksterilisation

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, dass nach VO (EG) Nr. 1069/2009 für die Verarbeitung von Material der Kategorie 1 vorgeschrieben ist (ANON. 2009b). Bei der Drucksterilisation werden Partikel mit einer Größe von höchstens 50 mm auf eine Kerntemperatur von über 133°C erhitzt und bei einem absoluten Druck von mindestens 3 bar für mindestens 20 Minuten auf dieser Temperatur gehalten.

Pasteurisierung

Bei der Pasteurisierung nach VO (EU) Nr. 142/2011 werden Partikel nicht größer als 12 mm für mindestens 60 Minuten auf mindestens 70°C erhitzt (ANON. 2011a). Durch Überwachungsgeräte muss sichergestellt werden, dass die vorgegebene Temperatur eine

Stunde lang gehalten wird. Dieses Verfahren muss u.a. angewendet werden, wenn z.B. Schlachtabfälle als Substrate für die Biogaserzeugung genutzt werden sollen.

Thermophile Vergärung

Laut Bioabfallverordnung ist die thermophile Vergärung ein hygienisierendes Verfahren. Voraussetzung hierfür ist eine Prozesstemperatur von mindestens 50°C, die über den zusammenhängenden Zeitraum der Mindestverweilzeit auf das gesamte Material einwirken muss (ANON. 2013a). Die Mindestverweilzeit im Fermenter muss, sofern sie nicht technisch mittels einer hydraulischen Absperrung innerhalb der Beschickungs- und Entnahmeintervalle vorgegeben ist, durch eine Untersuchung ermittelt werden. Diese Untersuchung ist ebenfalls in der Bioabfallverordnung beschrieben.

Thermo-Druck-Hydrolyse

Dieses Verfahren ist in der VO (EU) Nr. 142/2011 als eine Verarbeitungsmethode für Materialien der Kategorie 2 und 3 beschrieben (ANON. 2011a). Hierbei müssen die tierischen Nebenprodukte auf eine Kerntemperatur von mindestens 180°C erhitzt werden. Diese Temperatur muss für einen Zeitraum von mindestens 40 Minuten bei einem Druck von mindestens 12 bar gehalten werden. Das zu bearbeitende Material muss dabei ständig durchmischt werden.

2.3 Hygienische Aspekte beim Einsatz von Gärresten aus Biogasanlagen

2.3.1 Bakteriologische Risiken

Trotz der gesetzlichen Vorgaben bleibt die Frage des Risikos für Mensch und Tier durch pathogene Mikroorganismen in Gärresten von Biogasanlagen bestehen. Mit diesem Thema hat sich in der Vergangenheit eine Vielzahl an Autoren beschäftigt (u.a. BAGGE et al. 2005; WATCHARASUKARN et al. 2009; LEBUHN und WILDERER 2006; BAGGE et al. 2010). Ein Eintrag von Substraten mit einem höheren Gehalt an Krankheitserregern in die Biogasanlage kann nicht ausgeschlossen werden, so dass das Gärprodukt als belastet angesehen werden muss. Deshalb dürfen Substrate mit einem höheren seuchenhygienischen Potential nur in speziell zugelassenen Anlagen nach strengen rechtlichen Vorschriften verarbeitet werden. Die landwirtschaftliche Nutzung von Gärprodukten und Komposten aus diesen Substraten ist nur zulässig, sofern ihre hygienische Unbedenklichkeit nachgewiesen wurde (FACHVERBAND BIOGAS E. V. 2014).

Es gibt keine Studie die belegt, dass Krankheitserreger im Biogasprozess zunehmen (LEBUHN und FRÖSCHLE 2012). Vielmehr wurde gezeigt, dass sich die Konzentration untersuchter Krankheitserreger in Abhängigkeit von ihrer Widerstandsfähigkeit im Biogasprozess mehr oder weniger stark reduziert. Ausschlaggebend hierfür sind die Höhe der Prozesstemperatur

sowie die tatsächliche Verweildauer im Prozess (LEBUHN und FRÖSCHLE 2012). Je länger die Verweilzeit im anaeroben Abbau, desto intensiver ist die Einwirkung biologischer, chemischer und physikalischer Faktoren und somit deren abtötende oder inaktivierende Wirkung. Nach aktuellem Kenntnisstand hängt der hygienische Status des Gärrestes mit dem hygienischen Status der zugelieferten Rohstoffe zusammen (BREVES 2012; LEBUHN und FRÖSCHLE 2012). Dieses gilt in besonderem Maß für den Einsatz von Gülle in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Letztere liegen mit der Prozesstemperatur überwiegend im mesophilen Temperaturbereich (ca. 35°C-42°C, die Temperaturen können im Praxisbetrieb hiervon abweichen). Insbesondere widerstandsfähige Erreger (wie z.B. Sporenbildner) überleben den mesophilen Biogas-Prozess eher unbeschadet oder wenig dezimiert. Sie werden im thermophilen Betrieb (ca. 45°C-60°C) einer Biogasanlage wesentlich effizienter inaktiviert.

Die Verordnung (EU) Nr. 142/2011 (ANON. 2011a), Anhang V Kapitel III Abschnitt 2 gibt bei alternativen thermischen und chemischen Umwandlungsverfahren in Biogasanlagen für eine ausreichende Reduzierung biologischer Risiken den gesicherten Nachweis einer Reduktion um 5 log₁₀-Stufen für *Enterococcus (E.) faecalis* oder *Salmonella* Senftenberg (775W, H₂S-negativ) vor (ANON. 2011a). Bei gesicherten 55°C im Fermenter geben LEBUHN und WILDERER (2006) in ihren Modellversuchen eine Reduktion um ca. 3 log₁₀-Stufen für intestinale Enterokokken an. Fäkalcoliforme wurden um ca. 5 log₁₀-Stufen und coliforme Keime um ca. 4 log₁₀-Stufen reduziert. Hingegen blieben aerobe (*Bacillus* Arten) und anaerobe (*Clostridium perfringens*) Sporenbildner in ihrer Keimzahl nahezu unverändert (LEBUHN und WILDERER 2006). Auch HABER (2008) berichtet, dass die Keimzahlen von Clostridien in Gärprodukten und Gülle keinen Unterschied aufwiesen. Im Gegensatz hierzu berichten BAGGE und Kollegen (2010), dass Clostridien, im Vergleich zu *Bacillus* Arten, empfindlicher gegenüber Pasteurisierung und anaerobem Verdau reagierten. Sie beobachteten eine Reduktion der Clostridien, während *Bacillus* spp. den Prozess relativ unbeschadet überstanden (BAGGE et al. 2010). Dieses wird untermauert durch den Bericht von KNIE et al. (2001), wonach bei *Clostridium (C.) perfringens* eine Reduktion um 2-3 Zehnerpotenzen sowohl durch Vor- als auch durch Nachpasteurisierung erreicht werden kann. LEBUHN und FRÖSCHLE (2012) fassen zusammen, dass, nach dem aktuellen Stand der Forschung, Gärreste bezüglich des Hygienestatus im Vergleich zu den Substraten als besser einzustufen sind. In einer niedersächsischen Studie zur „Einschätzung des Risikopotentials der Biogastechnologie in mikrobiologischer Hinsicht“ wurde festgestellt, dass Gärreste im Vergleich zu den Rohstoffen, unabhängig vom Biogasanlagen Typ, immer um 0,5 – 2,5 log₁₀-Stufen niedrigere Keimzahlen aufwiesen (BREVES 2012). Aus dieser Studie geht weiterhin hervor, dass bei der Fermentation in Biogasanlagen keine spezifische Vermehrung von Clostridien stattfindet, sondern der Gehalt im Verhältnis zum Rohstoff abnimmt. *Clostridium botulinum* wurde in keiner der untersuchten Biogasanlagen nachgewiesen während

toxinbildende (Toxin α und β) *C. perfringens*-Stämme vor allem in Schweinegülle aber auch Rindergülle verarbeitenden Anlagen festgestellt wurden (BREVES 2012 und 2014; WEILAND et al. 2007). Die anaerobe Behandlung von Gülle führt nach Untersuchungen von RÜCKERT (1991) zu einer Reduktion bzw. Elimination von Salmonellen und anderen *Enterobacteriaceae*. Eine vollständige Abtötung der Bakterien wurde durch thermophile Faulung (55°C) erreicht, während die anaerobe, mesophile Faulung (35°C) von Schweinegülle eine Reduktion der genannten *Enterobacteriaceae* um 3 log₁₀-Stufen bewirkte. In Rindergülle hingegen wurde bei der mesophilen Faulung nur eine Reduktion um ca. 1 log₁₀-Stufe erreicht. Die thermophile Behandlung von Rindergülle führt nach RÜCKERT (1991) zur nahezu vollständigen Elimination dieser Bakterien. Nach Untersuchungen von ADE-KAPPELMANN (2008) wurden *Salmonella* Senftenberg W775 und *Campylobacter jejuni* in thermophil betriebenen Anaerobanlagen innerhalb von 1 h inaktiviert, während *E. faecalis* den Behandlungsprozess bis zu 3 h überlebte. Eine Aufenthaltszeit von 24 h bei 35°C im Biogasreaktor führte bei keinem der untersuchten Mikroorganismen zu einer Inaktivierung. Eine vollständige Abtötung von Mikroorganismen ist bei der anaeroben Behandlung ohne zusätzliche Hygienisierung nicht zu erreichen (ADE-KAPPELMANN 2008). Die anaerobe Kofermentation von Rinder- bzw. Schweinegülle mit Speiseabfällen im mesophilen Temperaturbereich kann nach HOFERER (2001) keine ausreichend sichere Inaktivierung potentieller Tierseuchenerreger im Biogassubstrat gewährleisten. Im thermophilen Temperaturbereich zeigt sich bei allen untersuchten Erregern (u.a. *Salmonella* Senftenberg, *Escherichia coli* O:157, *Enterococcus faecium*) eine ausreichende Reduktion. Mit Ausnahme von *Enterococcus faecium* wurden bei 55°C alle untersuchten Bakterien innerhalb eines Zeitraumes von 6 h um ≥ 4 log₁₀-Stufen reduziert. LEBUHN und WILDERER (2006) analysierten darüber hinaus das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter*-Bakterien und *Yersinia enterocolitica* in Vorgrube, Fermentern und Endlager. Sie zeigten, dass die Behandlung im Fermenter bei 55°C ausreicht, um beide Bakterienarten um mindestens 5 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Zusammenfassend betrachtet belegen diese Studien, dass pathogene Bakterien während des Biogasprozesses reduziert werden. Nach wissenschaftlichen Erkenntnissen ist der anaerobe Behandlungsprozess (Vergärung) aus hygienischer Sicht demzufolge ausdrücklich zu begrüßen (FACHVERBAND BIOGAS E. V. 2014).

2.3.2 Parasitäre Risiken

Als parasitäre Risiken kommen widerstandsfähige Dauerstadien (z.B. Oozysten von *Cryptosporidium* oder *Giardia*) sowie Spulwurm-Eier in Betracht. Die Eier von *Ascaris suum* sind in der Umwelt sehr widerstandsfähig und überleben in Gülle bei einer Temperatur von 8 – 18°C bis zu 85 Tage. Auf Austrocknung reagieren sie empfindlich, bei 55 – 56°C sind sie nach zehn Minuten inaktiviert (SCHNIEDER 2000). In Rindergülle sind Spulwurmeier 76 d infektiös, während sie in Festmist bei 40°C 25 d und bei 50°C 4 d überdauern (HOY 2002). Eine Tenazitätsprüfung mit Eiern von *Ascaris suum* als Prüforganismen in einer

Pasteurisierungseinheit kam zu dem Ergebnis, dass sich bei einer Betriebstemperatur von 70°C nach einer Aufenthaltszeit von 30 Minuten aus den Eiern keine Larven entwickelten (ADE-KAPPELMANN 2008). Die Autorin leitete daraus ab, dass die Parasitendauerstadien vollständig inaktiviert wurden. Ältere Studien berichten von einem Verlust der Infektiosität nach 1 h bei 50°C sowie 20 Minuten bei 55°C (LANG 1987) bzw. von einer vollständige Eliminierung aus Klärschlamm nach 10-minütiger thermophiler (54°C) anaerober Fermentation (PLACHY et al. 1997). Die Überlebensdauer von nicht-infektiösen *Ascaris suum* Eiern bei mesophiler (35-37°C), anaerober Fermentation über einen Zeitraum von 20 d wurde hingegen nur geringfügig beeinträchtigt (JURIS et al. 1996). KATO et al. (2003) haben den Effekt von aerober und anaerober Fermentation auf die Überlebensfähigkeit von *Ascaris suum* Eiern bei 37°C, 47°C und 55°C untersucht. Unter anaeroben Bedingungen bei 37°C waren nach zehn Tagen noch 10% der *Ascaris suum* Eier entwicklungsfähig, was signifikant unterschiedlich zur Überlebensrate von 80 – 93% bei aeroben Bedingungen war. Bei 47°C im anaeroben Milieu waren 99% der Ascariden-Eier nach 2 d inaktiviert, wohingegen aerobe Bedingungen für eine Überlebensdauer von 8 d sorgten. Eine Erhöhung der Temperatur auf 55°C reduzierte die Überlebensdauer auf 2 Tage. AITKEN et al. (2005) kommen zu einem ähnlichen Ergebnis und geben an, dass innerhalb von 30 min bei 53°C bzw. 55°C eine Reduktion der *Ascaris suum* Eier um ungefähr 3 log₁₀-Stufen stattfindet.

Kryptosporidien sind weltweit verbreitet und kommen als Zoonoseerreger bei vielen Säugetierarten vor. Die infektiösen Stadien (Zysten und Oozysten) werden mit dem Kot ausgeschieden (GORNICK 1997), sind chlorresistent und können über Jahre in der Umwelt überleben (DILLINGHAM et al. 2002). Mehr als 99% der *Cryptosporidium* (C.) *parvum* Oozysten werden nach 10 d bei 37°C, 2 d bei 47°C und 1 h bei 55°C inaktiviert (KATO et al. 2003). Keimträgerexperimente belegten, dass eine 4-stündige thermophile (gesicherte 55°C) anaerobe Vergärung von Rindergülle reicht, um die Infektiosität von Kryptosporidien-Oozysten um >5 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Wenn der Gärrest vom parasitologischen (und bakteriologischen) Standpunkt her einwandfrei und auch zur Ausbringung in sensiblen Regionen geeignet sein soll, ist eine gesicherte Verweilzeit von 4 h bei gesicherten 55°C als sinnvolle Zielgröße zur Behandlung von Rindergülle in Biogasanlagen anzusehen (LEBUHN und WILDERER 2006).

2.3.3 Virale Risiken

Aufgrund der breiten Palette an Roh- und Reststoffen, die als Substrate in Biogasanlagen eingesetzt werden können, spielt auch die Überlebensfähigkeit von viralen Krankheitserregern im Biogasprozess eine wichtige Rolle. Erwähnenswert sind hier z.B. Parvoviren, Rotaviren, Caliciviren (*Norovirus*) oder Enteroviren. Letztere zeichnen sich durch eine hohe Tenazität aus. Sie sind im sauren Milieu (bis zu pH 2) stabil, reagieren jedoch wärmeempfindlich und verlieren bei 55°C innerhalb von 30 min ihre Infektiosität (ROLLE und

MAYR 2007). Rotaviren sind ebenfalls gegenüber Umwelteinflüssen stabil. Bei 20°C bleibt ihre Infektiosität für 7-12 Monate erhalten. Zu den sehr widerstandsfähigen Viren gehören Parvoviren, die erst bei Temperaturen von 80-90°C inaktiviert werden. Sie sind umwelt- und pH-stabil (ROLLE und MAYR 2007). Zur Tenazität von humanen Noroviren ist bisher wenig bekannt. Sie tolerieren einen niedrigen pH-Wert und verlieren im Temperaturbereich oberhalb von 70°C in Abhängigkeit von der gewählten Haltezeit an Infektiosität (BfR 2012). Bei dem gegenwärtigen Kenntnisstand können Rotaviren und Enteroviren hinsichtlich Hygienisierung durch Vergärung als unkritische Parameter angesehen werden (LEBUHN und WILDERER 2006). Tenazitätsuntersuchungen (im Prüfkörperverfahren in Modellanlagen) mit *Ungulate bocaparvovirus 1* (*Bovines Parvovirus*) ergaben, dass die mesophile Faulung zu einer Reduktion um ca. 2 Zehnerpotenzen führte, während eine thermophile Faulung i.d.R. innerhalb von ca. 24 h eine Reduktion um 2-3 log₁₀-Stufen bewirkte (KNIE et al. 2001). Bei Versuchen in großtechnischen Biogasanlagen wurden bis zu 7 log₁₀-Stufen innerhalb einer 24-stündigen Kontaktzeit im Biogasreaktor erreicht. Sowohl Vor- als auch Nachpasteurisierung für 1 h bei 70°C reduzierte das *Ungulate bocaparvovirus 1* um maximal 5 Zehnerpotenzen (KNIE et al. 2001). In den thermophil betriebenen Praxisanlagen war nach 7 d bzw. 14 d kein Virus mehr nachweisbar. DRČA (2007) berichtet, dass eine bei 70°C für 30 min durchgeführte Hygienisierung nicht zur vollständigen Inaktivierung dieses Parvovirus' führte, jedoch eine Reduktion um bis zu vier Zehnerpotenzen erreichte. *Bovines Enterovirus* Typ 1 (ECBO-Virus) konnte bei 70°C, nach einer Aufheizphase von 41 min, nicht mehr nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden für das feline *Calicivirus* erreicht (DRČA 2007), das als Surrogat für Noroviren angesehen werden kann (LEBUHN und WILDERER 2006). *Bovines Enterovirus* war nach 30 Minuten bei 55°C nicht mehr nachweisbar, während im mesophilen (35°C) Versuchsaufbau ein sporadischer Nachweis erfolgte (MONTEITH et al. 1986).

2.3.4 Phytohygienische Risiken

Gärreste aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen unterliegen beim Inverkehrbringen auch den Anforderungen der DüMV an die Phytohygiene. Das Gefährdungspotential durch Schaderreger und Unkrautsamen in Gärprodukten aus der Biogaserzeugung ist als gering einzustufen (HOFMANN und SCHULTHEISS 2013). Generell gilt, dass mit Quarantäneschädlingen befallene Substrate nicht in Biogasanlagen verwertet, sondern vernichtet werden müssen. Optimale Bedingungen bei der Silierung sind in vielen Fällen ausreichend, um eine Inaktivierung von Krankheitserregern herbei zu führen (GEROWITT und WESTERMANN 2012; SEIGNER et al. 2012). Unter Laborbedingungen war eine Verweilzeit von 6 h ausreichend, um die meisten viralen, bakteriellen und pilzlichen Pathogene der gängigen Substrate zu inaktivieren (GEROWITT und WESTERMANN 2012). Die Vergärung im Biogasprozess führte grundsätzlich zu einer Reduktion der Keimbelastung, jedoch waren bestimmte Schadorganismen wie z.B. der Erreger der bakteriellen

Kartoffelringfäule, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, in der Lage, den anaeroben Fermentationsprozess über einen längeren Zeitraum zu überstehen; in diesem Fall bis zu 100 Tage in Abhängigkeit von der Substrataufbereitung. Neben der Temperatur und der Verweilzeit des Substrats im Biogasfermenter hatte das umgebende Milieu Einfluss auf die Überlebensfähigkeit (SEIGNER et al. 2012). Nach Verweilzeiten von wenigstens 30 – 40 Tagen bei einer Fermentertemperatur von mindestens 38°C geht von den meisten Phytopathogenen kein sanitäres Risiko aus. Die mesophile Fermentation ist jedoch nicht als hygienisierende Maßnahme für den Erreger des Kartoffelkrebses (*Synchytrium endobioticum*), der bakteriellen Ringfäule (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) und der Schleimkrankheit der Kartoffel (*Ralstonia solanacearum*) geeignet. Bezüglich des Erregers der Hopfenwelke (*Verticillium albo-atrum*) der bakteriellen Gräserwelke (*Xanthomonas translucens* pv. *graminis*) oder thermoresistenten Viren kann eine zusätzliche Hygienisierung notwendig sein (SEIGNER et al. 2012).

Zusammenfassend betrachtet stellt die Ausbringung von Gärresten aus der landwirtschaftlichen Biogasanlage bei Beachtung der geltenden Regeln und Empfehlungen keine gesundheitliche Gefahr für Mensch, Tier oder Pflanze dar. Vielmehr ist eine Verbesserung der hygienischen Situation durch den Einsatz von Gärresten gegeben (LEBUHN und FRÖSCHLE 2012).

2.4 Beschreibung der ausgewählten Indikatororganismen

Bei Indikatororganismen handelt es sich um Organismen, deren enge Bindung ihrer Lebensfunktionen an bestimmte Umweltfaktoren dazu führt, dass ihr Vorhandensein Rückschlüsse auf die Umweltfaktoren zulässt (SCHUBERT 1985). Gemäß VO (EU) Nr. 142/2011 (ANON. 2011a) ist definiert, dass ein Indikatororganismus im Rohmaterial ständig in hoher Anzahl vorhanden sein muss. Seine Tenazität muss der Tenazität der Pathogene ähnlich sein, zu deren Überwachung er verwendet wird; sie darf nicht darunter liegen. Der Indikatororganismus muss leicht zu ermitteln und zu bestätigen sein.

Die für diese Arbeit ausgewählten und nachfolgend beschriebenen Indikatororganismen waren durch die Leistungsbeschreibung des Landesamtes für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie vorgegeben. Zusätzlich zu den eigentlichen Indikatororganismen (*Escherichia coli*, *E. faecalis*, *C. perfringens*) war in der Leistungsbeschreibung die Untersuchung auf folgende Bakterien vorgesehen: *Clostridium botulinum*, Extended Spectrum β -Lactamase-bildende Bakterien sowie Salmonellen.

2.4.1 Clostridium perfringens

Clostridien sind große, grampositive anaerobe Sporenbildner, die ubiquitär im Erdboden sowie im Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier vorkommen. Im Erdboden wirken Clostridien durch ihre proteolytischen Eigenschaften vor allem am Eiweißabbau mit

(SCHOOP 1980). Die von Clostridien gebildeten Sporen sind sehr widerstandsfähig und können mehrere Jahre im Erdboden überleben. Mehr als 100 *Clostridium* Spezies wurden beschrieben; etwa 20 Spezies sind pathogen (QUINN et al. 2011). Pathogene *Clostridium* Spezies werden aufgrund ihrer Toxin-Aktivität und der Gewebe, die sie schädigen, in verschiedene Kategorien eingeteilt. *C. perfringens* gehört zur Gruppe der „enteropathogenen und Enterotoxämie-verursachenden Clostridien“. Aufgrund der Bildung verschiedener Exotoxine werden bei *C. perfringens* fünf verschiedene Typen (A-E) unterschieden, die unterschiedliche Krankheitsbilder verursachen. Die vier Majortoxine sind α , β , ϵ , und ι (QUINN et al. 2011). Des Weiteren wird ein Enterotoxin gebildet, das beim Menschen Lebensmittelvergiftungen hervorrufen kann. Toxin-bildende *C. perfringens* kommen auch im Darm gesunder Tiere vor, hier ist der Typ A am häufigsten vertreten (BISPING und AMTSBERG 1988). Der physiologische *C. perfringens*-Gehalt pro g Rinderkot liegt zwischen $\leq 10^3$ (adulte Tiere) und 10^5 - 10^6 (Kälber) (KRÜGER 2010). In Faeces von Schweinen und Hühnern liegen die Werte bei 4×10^3 bzw. $2,5 \times 10^2$ (GELDREICH 1978). Bei erkrankten Schweinen konnte der Nachweis von bis zu 10^9 *C. perfringens*/g Kot erbracht werden (EL SUKHON 1974). Prädisponierende Faktoren für eine unphysiologische Vermehrung von *C. perfringens* im Darmtrakt sind eine plötzliche Futterumstellung sowie Fehler im Haltungsmanagement. Oft ist *C. perfringens* an multifaktoriellen Krankheitsgeschehen beteiligt.

In Schweine- und Rindergülle verarbeitenden Biogasanlagen wurden α - und β_2 -Toxin-bildende *C. perfringens*-Stämme sowohl im Gärsubstrat als auch im Gärrest festgestellt (BREVES 2014). Auch in Anlagen, die ausschließlich mit Mais und nachwachsenden Rohstoffen betrieben werden, waren α -Toxin-bildende *C. perfringens* nachweisbar (BREVES 2014).

2.4.2 Clostridium botulinum

Clostridium (*C.*) *botulinum* gehört zu den Vertretern der neurotoxischen Gruppe der Clostridien, welche neuromuskuläre Funktionen beeinflussen. Nach oraler Aufnahme von *C. botulinum*-Toxin über die Nahrung oder das Futter kommt es zu einer schlaffen Lähmung der Muskulatur und nachfolgend zum Tod durch Atemlähmung (QUINN et al. 2011). Kontrovers diskutiert wird der sogenannte „viszerale Botulismus“, der durch Besiedelung unterer Darmabschnitte mit *C. botulinum* und im Darm gebildetes Botulinum-Toxin verursacht werden soll. Die kontinuierliche Resorption geringer Mengen des Toxins soll zur Ausprägung des Krankheitsbildes eines „chronischen Botulismus“ führen und durch unspezifische Symptome und Leistungseinbußen gekennzeichnet sein (BÖHNEL et al. 2001). Der Abschlussbericht eines Kooperationsprojektes der Stiftung Tierärztliche Hannover und des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) Jena zu diesem Thema resümiert, dass nach Auswertung von Daten aus 139 Betrieben die Hypothese des „viszeralen“ oder „chronischen“ Botulismus

nicht bestätigt werden kann (FLI 2014a). *C. botulinum*-Endosporen kommen ubiquitär im Erdboden, in Schlamm und im Bodensediment von Gewässern vor (BISPING und AMTSBERG 1988; WHITLOCK 2004). Im Hinblick auf die Clostridien-Belastung im Futtermittel sind vor allem tiefes Abmähen bei der Futtergewinnung, Geflügelkotdüngung, schlechte Silierung (zu hoher pH-Wert) und Tierkadaver (z.B. Kleinnager) in Heu oder Silage zu nennen (QUINN et al. 2011). *C. botulinum* kommt auch im Darminhalt gesunder Wirbeltiere (z.B. Rind, Schwein, Katze, Geflügel) vor. Für die Verbreitung spielen jedoch Kadaver eine wesentliche Rolle (SONNENSCHNEIN 1980). Aufgrund der Bildung verschiedener Toxine werden sieben *C. botulinum* Toxin-Typen (A-G) unterschieden (BISPING und AMTSBERG. 1988; WHITLOCK 2004; QUINN et al. 2011). Die Neurotoxine von *C. botulinum* sind hochwirksame Gifte. Hinsichtlich der Empfänglichkeit gegenüber oral aufgenommenem Botulinum-Toxin bestehen beträchtliche tierartliche Unterschiede. Verglichen mit Pflanzenfressern sind Fleisch- und Aasfresser wenig empfindlich für alle Toxintypen (SONNENSCHNEIN 1980). Menschliche Erkrankungsfälle werden von den Toxintypen A, B, sowie E-G beschrieben (QUINN et al. 2011). Typ A und C-Erkrankungen kommen beim Hund vor, während beim Rind vorwiegend Typ C und D, seltener auch Typ A, zu Erkrankungen führt. Beim Pferd wird Botulismus durch die Typen A-D verursacht (SONNENSCHNEIN 1980; QUINN et al. 2011). Schweine sind empfänglich gegenüber Toxin-Typ A (QUINN et al. 2011). Hingegen wurden Massenvergiftungen insbesondere bei wildlebendem Wassergeflügel durch Typ C-Toxin beobachtet (SONNENSCHNEIN 1980).

Das Risiko einer möglichen *C. botulinum*-Anreicherung im Biogasprozess wurde mehrfach untersucht und konnte bis jetzt nicht bestätigt werden. Im Gegenteil finden sich im Gärsubstrat mehr Clostridien (einschließlich *C. botulinum*) als in den Gärresten (WEILAND et al. 2007). Dieses bestätigen BAGGE et al. (2010), die *C. botulinum* ausschließlich in Gülle und Schlachtabfällen nachweisen konnten. Am Ende des Biogasprozesses waren keine pathogenen Clostridien (einschließlich *C. botulinum*) nachweisbar und die Gesamtzahl an *Clostridium* spp. hatte sich verringert. In einer aktuellen Untersuchung von Gärsubstraten und Gärresten aus fünfzehn Biogasanlagen konnten keine Neurotoxin-bildenden *C. botulinum* nachgewiesen werden (BREVES 2014), was die vorangehend beschriebenen Ergebnisse unterstützt.

2.4.3 Fäkalstreptokokken

Fäkalstreptokokken gehören zur Gattung *Enterococcus*, einer Gruppe von grampositiven Kokken. Sie sind Bestandteil der normalen Darmflora von Mensch und Tier, wobei *E. faecalis* und *E. faecium* am häufigsten isoliert werden (QUINN et al. 2011). Die durchschnittliche Konzentration an Fäkalstreptokokken im Kot wurde mit 10^6 (Rind) bzw. ca. 10^8 (Schwein) angegeben (GELBREICH 1978). Obwohl sie keine Sporen bilden, sind Enterokokken gegenüber Austrocknung hoch widerstandsfähig. Sie tolerieren extreme pH-Werte,

ionisierende Strahlung, osmotischen und oxidativen Stress, hohe Konzentrationen an Schwermetallen sowie Antibiotika. Im Gegensatz zu anderen mesophilen Bakterien überleben bzw. wachsen Enterokokken in einem Temperaturbereich von +10°C bis +45°C.

Die Gattung *Enterococcus* umfasst augenblicklich 37 Spezies. Sie sind als Krankheitserreger beim Tier von untergeordneter Bedeutung (BISPING et al. 1988), können aber als opportunistische Erreger zu Wundinfektionen, Mastitis, Zystitis oder Endokarditis führen (QUINN et al. 2011). Zunehmende Bedeutung erlangen Vancomycin-resistente *E. faecium* Isolate, die auch von Tieren isoliert wurden (QUINN et al. 2011). Vor allem *E. faecium* besitzt eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber Vancomycin, Ampicillin und hohen Konzentrationen von Aminoglykosid-Antibiotika weshalb es als multiresistenter Krankheitserreger in der Krankenhaushygiene eine große Rolle spielt (AGUDELO HIGUITA und HUYCKE 2014).

Zur Charakterisierung des hygienischen Status der Gärsubstrate sowie der Gärreste wurde die Untersuchung auf Fäkalstreptokokken als zielführend angesehen (REINHOLD und JAHN 2004).

2.4.4 Escherichia coli

Escherichia (E.) coli gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Hierbei handelt es sich um eine große Gruppe heterogener, gramnegativer, fakultativ anaerober Stäbchen (QUINN et al. 2011). Innerhalb der Gattung *Escherichia* ist nur *E. coli* in der Tiermedizin von Bedeutung (CARTER und WISE 2004). Der natürliche Standort von *E. coli* ist der Darmtrakt des Menschen und vieler Tierarten. 10^7 bis 10^9 *E. coli*/g Kot sind bei Säugetieren üblicherweise nachweisbar (GYLES und FAIRBROTHER 2004). Als opportunistische Erreger verursachen *E. coli* außerhalb ihres physiologischen Habitats unter anderem Zystitis und Mastitis (BISPING et al. 1988; CARTER und WISE 2004; QUINN et al. 2011). In Abhängigkeit von der Tierart und vom Krankheitsbild treten bestimmte *E. coli* Serotypen vermehrt auf, was für eine erhöhte Pathogenität für bestimmte Tierarten spricht (BISPING und AMTSBERG 1988; GYLES und FAIRBROTHER 2004).

Derzeit werden sieben *E. coli* Pathovaren unterschieden, die zu Magen-Darm-Erkrankungen, Erkrankungen außerhalb des Magen-Darm-Traktes und Septikämie führen können. Darunter stellen Enterotoxin-bildende (enterotoxische) *E. coli* (ETEC) die Hauptursache für Durchfall in der Nutztierzucht dar. Hierzu gehören aber auch Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC), die weltweit als Zoonoseerreger von Bedeutung sind. Diese werden synonym auch Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) genannt. Sie stehen im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen bei neugeborenen Wiederkäuern, älteren Kälbern, sowie der Ödem-Krankheit der Absatzferkel (BISPING und AMTSBERG 1988; CARTER und WISE 2004; QUINN et al. 2011). STEC Stämme, die beim Menschen zu einer hämorrhagischen Enteritis führen, werden auch

enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) genannt. In diesem Zusammenhang spielt v.a. der Serotyp O157:H7 eine wichtige Rolle (GYLES und FAIRBROTHER 2004). Die minimale EHEC Infektionsdosis für den Menschen beträgt 100 Kolonie-bildende Einheiten (DASCHNER et al. 2006). Wiederkäuer, vor allem Rinder, Schafe und Ziegen, aber auch Wildwiederkäuer werden als wichtiges Reservoir und Hauptinfektionsquelle für EHEC beim Menschen angesehen. Vereinzelt wurde nachgewiesen, dass auch andere landwirtschaftliche Nutztiere sowie Heimtiere EHEC ausscheiden (RKI 2004). Weitere intestinale *E. coli*-Pathovaren sind: enteropathogene *E. coli* (EPEC), die u.a. Durchfall beim Schwein verursachen, enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAaggEC) und diffus-adhärierende enteropathogene *E. coli* (DAEC). Zu den extraintestinalen pathogenen *E. coli* (ExPEC) zählen uropathogene *E. coli* (UPEC), die Zystitis, Pyelonephritis oder coliforme Mastitis verursachen sowie aviäre pathogene *E. coli* (APEC), die systemische Infektionen beim Geflügel hervorrufen (GYLES und FAIRBROTHER 2004). In der Umwelt kann *E. coli* über Wochen und Monate überleben (QUINN et al. 2000) und somit eine Infektionsquelle für empfängliche Individuen darstellen.

Escherichia coli, *E. faecalis* sowie Salmonellen finden in der VO (EU) Nr. 142/2011 (ANON. 2011a) bei der Untersuchung für das Inverkehrbringen von Gärresten Erwähnung (siehe 2.1).

2.4.5 *Salmonella* spp.

Salmonellen gehören ebenfalls zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie umfassen eine große Gruppe gramnegativer Bakterien mit 2 Spezies (*Salmonella* (*S.*) *enterica*, *S. bongori*) und ca. 2.500 Serotypen (LIBBY et al. 2004). Einige Salmonellenarten sind wirtsspezifisch, wie z.B. *S. Gallinarum* (Geflügel), *S. Pullorum* (Geflügel), *S. Choleraesuis* (Schwein) oder *S. Dublin* (Rind), während andere Serotypen, wie z.B. *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* ein sehr breites Wirtsspektrum und zoonotisches Potential besitzen (LIBBY et al. 2004; QUINN et al. 2011). Salmonellen kommen weltweit bei Mensch und Tier vor. Hauptreservoir der Salmonellen sind meistens nicht erkrankte Träger-Tiere (Säuger, (Wild-) Vögel, Reptilien). Landwirtschaftliche Nutztiere wie Rinder, Schweine und Geflügel und die daraus erzeugten tierischen Lebensmittel stehen als mögliche Infektionsursache im Vordergrund (AMMON und BRÄUNIG 2002). Die Krankheitssymptome und das Ausmaß der Erkrankung sind abhängig vom *Salmonella* Serotyp. Die Salmonellose beim Tier manifestiert sich hauptsächlich als akute Darmentzündung mit Durchfall und Septikämie, aber auch als Abort (z.B. *S. Abortusovis*, *S. Dublin*). Beim Menschen sieht man meist eine akute Darmentzündung mit plötzlich einsetzendem Durchfall, Kopf- und Bauchschmerzen, Unwohlsein und manchmal Erbrechen. Häufig tritt leichtes Fieber auf. Die Salmonellose ist die klassische Lebensmittelinfektion und wird vor allem über nicht ausreichend erhitzte Eier bzw. eierhaltige Speisen sowie über rohes bzw. nicht oder nicht ausreichend erhitztes Fleisch übertragen (AMMON und BRÄUNIG 2002). Nach deutschem Tierseuchenrecht ist die Salmonellose (*Salmonella* spp.) vieler Tierarten meldepflichtig (ANON. 2011b). Eine

Anzeigepflicht besteht nach § 4 der Geflügel-Salmonellen-Verordnung (i. d. F. der Bekanntmachung vom 17. Januar 2014) (ANON. 2014a) sowie nach § 1 Nummer 28 der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (i. d. F. der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011) (ANON. 2011c) für die Salmonellose des Rindes (ANON. 1991). Im Jahr 2012 wurden bundesweit 102 Ausbrüche der Rinder-Salmonellose angezeigt; im Freistaat Sachsen waren es vier Ausbrüche (FLI 2014b). Für denselben Zeitraum wurden laut Tiergesundheitsbericht des FLI 609 Fälle beim Schwein und 128 Fälle bei Hühnern gemeldet. Laut dem Infektionsepidemiologischen Jahrbuch des Robert Koch-Instituts stand die Salmonellose des Menschen im Jahr 2012 mit 20.849 gemeldeten Fällen an vierter Stelle aller meldepflichtigen Krankheiten in Deutschland (RKI 2013). Salmonellen sind widerstandsfähig und können über mehrere Monate in feuchtem Boden, Faeces und Wasser überdauern (QUINN et al. 2000). Sie vermehren sich bei Temperaturen bis 43°C.

Nach Untersuchungen von ADE-KAPPELMANN (2008) wurde *Salmonella* Senftenberg W775 in Keimträgerversuchen im Biogasprozess in thermophil betriebenen Anaerob-Anlagen innerhalb von 1 h inaktiviert. LEBUHN und FRÖSCHLE (2012) konnten schon nach 30-minütiger Inkubationszeit im thermophilen Temperaturbereich (60°C) keine Salmonellen im Keimträgerversuch mehr nachweisen. Hingegen verlief die Keimreduktion im mesophilen Bereich (38°C) des Biogasprozesses wesentlich langsamer, so dass eine Abtötung von 90% der Salmonellen erst nach ca. 7 h erreicht wurde (LEBUHN und FRÖSCHLE 2012).

2.4.6 Extended-Spectrum β -Lactamase-bildende Bakterien (ESBL)

β -Laktamasen sind Enzyme, die von zahlreichen Bakterien gebildet werden. Sie sind in der Lage, den β -Laktam-Ring, der allen β -Laktam-Antibiotika gemeinsam ist, zu spalten und die Wirkung der Antibiotika zu verhindern. Sie tragen somit zur Entstehung von Antibiotikaresistenzen bei. ESBL-bildende Bakterien können ein erweitertes Spektrum an β -Laktam-Antibiotika spalten und erhöhen somit auch den Einsatz von sogenannten Reserve-Antibiotika in der humanmedizinischen Therapie (FRIESE und RÖSLER 2013; GESER et al. 2012). Die Zunahme von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien stellt weltweit ein therapeutisches Problem in der Human- und Tiermedizin dar. Vor allem die Zunahme an *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation wurde in den letzten 10 Jahren stetig beobachtet (EWERS et al. 2012). Waren ESBL-bildende Bakterien bisher vor allem aus krankenhaushygienischer Sicht von großem Interesse, zeigen neuere Studien den vermehrten Nachweis v. a. ESBL-/Cephalosporinase (AmpC)-bildender *E. coli* in Lebensmittel-liefernden Tieren (EWERS et al. 2012). Zahlreiche Darmbakterien können ESBL-Resistenzen tragen. Bisher wurden diese Resistenzen vor allem in *E. coli* und *Klebsiella*, selten auch in *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Pseudomonas* gesehen. In der Nutztierhaltung sind ESBL-bildende Bakterien, vor allem *E. coli*, weit verbreitet (PFEIFER und ELLER 2012; GESER et al. 2012). Die Prävalenz variiert je nach

untersuchter Nutztierart und Studie zwischen 0,3% und 63% (BÜCHTER 2010; GESER et al. 2011; GESER et al. 2012). Auch in freilebenden Wildschweinen wurden ESBL-produzierende Bakterien nachgewiesen (LITERAK et al. 2009). Die Verbreitung und Übertragung von ESBL-produzierenden Bakterien z.B. über Tierkontakte oder die Lebensmittelkette ist vielfältig möglich (PFEIFER et al. 2013). In Gärresten aus Biogasanlagen wurden ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* (10^0 bis 10^4 KbE/g) sowie Spezies anderer Bakterien-Familien nachgewiesen (SCHAUSS et al. 2015), weshalb eine Übertragung dieser Bakterien über Gärrest-gedüngte Nutzflächen denkbar ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In den folgenden Übersichten sind die verwendeten Bakterien, Nährmedien, Biochemischen Identifizierungssysteme, Chemikalien und Reagenzien, Testkits, Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

3.1.1 Bakterien

Stamm/Isolat	Herkunft
<i>Clostridium (C.) botulinum</i> Typ A (S0174/09, REB 1472)	FLI, Jena
<i>C. botulinum</i> Typ B (BC 36/06, REB 1931)	FLI, Jena
<i>C. botulinum</i> Typ C (S0028/10, REB 1455)	FLI, Jena
<i>C. botulinum</i> Typ D (Stamm B-1720-01)	IMB, München
<i>C. botulinum</i> Typ E (S0187/09, (EB 1718)	FLI, Jena
<i>C. botulinum</i> Typ F (BC 69/06, CTC 10281)	FLI, Jena
<i>C. bifermentas</i> (Feldisolat)	Tierhygiene, Leipzig
<i>C. butyricum</i> (Feldisolat)	Tierhygiene, Leipzig
<i>C. difficile</i> (Feldisolat)	Tierhygiene, Leipzig
<i>C. novyi</i> (REN 773)	IZW, Berlin
<i>C. perfringens</i> Typ A (DSM 756)	DSMZ, Braunschweig
<i>C. perfringens</i> Typ B (ATCC 3626)	IZW, Berlin
<i>C. perfringens</i> Typ C (NCTC 3180)	IZW, Berlin
<i>C. perfringens</i> Typ D (ATCC 12917)	IZW, Berlin
<i>C. perfringens</i> Typ D (NCTC 8504)	IZW, Berlin
<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	IZW, Berlin
<i>C. sordellii</i> (Feldisolat)	Tierhygiene, Leipzig
<i>C. sporogenes</i> (Feldisolat)	Tierhygiene, Leipzig
<i>C. subterminale</i> (Feldisolat)	Tierhygiene, Leipzig

Stamm/Isolat	Herkunft
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	DSMZ, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> (DSM 1103)	DSMZ, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> 003-13-2 (CTX-M 15 TEM) (Feldisolat)	IZW, Berlin
<i>Escherichia coli</i> 0010-73-1 (CTX-M 1) (Feldisolat)	IZW, Berlin
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SHV-18 (ATCC 700603)	DSMZ, Braunschweig
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DSM 14221)	DSMZ, Braunschweig
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	DSMZ, Braunschweig

3.1.2 Nährmedien sowie deren Bestandteile

Nährmedium/Bestandteil	Hersteller
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
<i>Brilliance</i> TM E. coli/Coliform Selektiv Agar	OXOID GmbH, Deutschland
<i>Brilliance</i> TM ESBL Agar	OXOID GmbH, Deutschland
<i>Brilliance</i> TM Salmonella Agar	OXOID GmbH, Deutschland
Bromkresolpurpur	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Columbia-Agar mit Schafblut ^{PLUS}	OXOID GmbH, Deutschland
Eigelb-Emulsion	OXOID GmbH, Deutschland
Enterococcus Selektivagar (BAA) (Galle Äsculin Azid Agar)	OXOID GmbH, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Lactose Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
L-Cystein-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
mCP-Selektivnährboden	OXOID GmbH, Deutschland
Müller Hinton Bouillon	Sifin GmbH, Deutschland
Nährbouillon für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Pepton aus Fleisch peptisch verdaut	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Slanetz Bartley Agar (Enterokokken-Nährboden)	OXOID GmbH, Deutschland
Standard-Nähragar I für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Tergitol 7 Lactose TTC Agar	OXOID GmbH, Deutschland
Trypton/Pepton aus Casein pankreatisch verdaut	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
TSC Agar (Basis)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
TSC Agar (<i>Clostridium perfringens</i> -Nährboden)	OXOID GmbH, Deutschland
XLD Agar	OXOID GmbH, Deutschland
XLT4 Agar	OXOID GmbH, Deutschland
α-D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

Rezept für die Nährbouillon

Zutat	Menge
Nährbouillon	8,0 g
Aqua dest.	1,0 l
Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten	

Rezept für Standard-Nähragar I

Zutat	Menge
Standard-Nähragar I	37,0 g
Aqua dest.	1,0 l
Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten	

Rezept für Eigelb Laktose Agar zur Anzucht von anaerob wachsenden Bakterien

Zutat	Menge
Standard-Nähragar I	35,0 g
L-Cystein-Hydrochlorid	0,5 g
Lactose Monohydrat	10,0 g
Bromkresolpurpur (0,4%)	10,0 ml
Agar-Agar	10,0 g
Aqua dest.	1,0 l
Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten; abkühlen auf 50°C, dann sterile Eigelbemulsion hinzufügen	
	100,0 ml

Rezept für TPYG-Bouillon (Trypticase Peptone Yeast Glucose Bouillon) zur Anreicherung von anaerob wachsenden Bakterien

Zutat	Menge
Pepton aus Fleisch peptisch verdaut	5,0 g
Trypton/Pepton aus Casein pankreatisch verdaut	50,0 g
Hefeextrakt	20,0 g
α -D(+)-Glucose Monohydrat	4,0 g
Natriumthioglykolat	1,0 g
Aqua dest.	1,0 l
Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten	

3.1.3 Biochemische Identifizierungssysteme

Identifizierungssystem	Hersteller
Micronaut-S β -Lactamase VII	Sifin GmbH, Deutschland
RapID™ ANA II System	Thermo Scientific™ Inc., USA
RapID™ ONE System	Thermo Scientific™ Inc., USA

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific™ Inc., USA
Ethanol, absolut für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Deutschland
HDGreen™ Plus	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Deutschland
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit	Roche Deutschland Holding GmbH
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	Qiagen GmbH, Deutschland
RapID™ Inokulationsflüssigkeit	Thermo Scientific™ Inc., USA
RapID™ Spot Indol Reagenz	Thermo Scientific™ Inc., USA
Remel™ BactiDrop™ Oxidase	Thermo Scientific™ Inc., USA
Remel™ BactiDrop™ Spot Indole (DMACA)	Thermo Scientific™ Inc., USA
Taq PCR Core Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Scientific™ Inc., USA
DNA Ladder 50 bp	AppliChem GmbH, Deutschland

3.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
AnaeroJar (2,5 l)	OXOID GmbH, Deutschland
Anaerobiertopf (3,5 l)	OXOID GmbH, Deutschland
Laboratory Blender Stomacher 400	Seward Limited, United Kingdom
Mikrobiologischer Brutschrank B 12	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Mikrobiologischer Brutschrank B 6760	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Thermocycler Biometra® Tprofessional	Biometra GmbH, Deutschland
Thermocycler Stratagene Mx3000P™	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
PowerPac™ 200 Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Ammoniak – Lösung 32% reinst	AppliChem GmbH, Deutschland
Anaerobierindikator	OXOID GmbH, Deutschland
AnaeroGen (2,5 l und 3,5 l)	OXOID GmbH, Deutschland
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter, 1000 µl	Sarstedt, Deutschland
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter, 100 µl	Sarstedt, Deutschland
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter, 10 µl	Sarstedt, Deutschland
Einmalimpfösen 10 µl, kalibriert	Laborfachhandel Schubert, Deutschland
Labor-Homogenisationsbeutel Stomacher®	VWR International, Deutschland
Petrischalen mit Nocken	Sarstedt, Deutschland
Schraubröhrchen 15 ml	Sarstedt, Deutschland
Schraubröhrchen 50 ml	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Deutschland
Wattestäbchen, steril, 15 cm	Henry Schein VET GmbH, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Charakteristik der verwendeten Nährmedien

Tergitol 7 Lactose TTC Agar (TTC Agar)

Tergitol 7 Lactose TTC Agar ist ein Nährboden zur selektiven Isolierung, Differenzierung und Quantifizierung von coliformen Keimen aus Lebensmittel- und Wasserproben. Das Tergitol 7 hemmt das Wachstum grampositiver Keime und schränkt das Schwärmen von *Proteus* ein wodurch der Nachweis von coliformen Keimen begünstigt wird. Die Laktoseverwertung coliformer Keime wird durch den Farbumschlag des Bromthymolblau-Indikators nach gelb bei Säurebildung angezeigt. Eine Differenzierung von coliformen Keimen, *E. coli* und *Enterobacter aerogenes* erfolgt über das enthaltene Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), das von den meisten coliformen Keimen zu einem unlöslichen roten Formazan reduziert wird. *E. coli* wächst auf diesem Nährboden laut Hersteller in gelben Kolonien mit gelben Hof (siehe 4.1.2.4), *Enterobacter* und *Klebsiella* spp. produzieren grünlich-gelbe Kolonien während *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* und *Pseudomonas* spp. als rote Kolonien mit bläulichem Hof wachsen (OXOID 2003). In der Anlage 5 der Trinkwasserverordnung (ANON. 2013b) ist für den Nachweis von *E. coli* und coliformen Keimen die DIN EN ISO 9308-1:2001-07 als Referenzverfahren angegeben, die TTC als zu verwendendes Medium aufführt.

Brilliance™ E. coli/Coliform Selektiv Agar

Der **Brilliance™ E. coli/Coliform Selektiv Agar** ist ein chromogenes Selektivmedium zum Nachweis und zur Keimzahlbestimmung von *E. coli* und anderen Coliformen aus Lebensmittel- und Wasserproben. Dieser Agar enthält zwei chromogene Substrate (Rose-Gal, X-Glu), die eine Differenzierung zwischen *E. coli* und coliformen Keimen ermöglichen. Das Enzym β -Glucuronidase, das ausschließlich im Genom von *E. coli* vorkommt, sowie die β -Galactosidase, die von Laktose-positiven Coliformen produziert wird, führen dazu, dass *E. coli* auf diesem Agar eine violett aussehende Koloniefarbe hat (Abbildung 8). Coliforme Keime können nur X-Glu mittels β -Galactosidase spalten und wachsen daher als rosa Kolonien. Das Wachstum grampositiver Bakterien wird durch den Zusatz von Natriumlaurylsulfat unterdrückt. Andere Organismen mit β -Glucuronidase-Aktivität erscheinen als farblose oder blaue Kolonien (OXOID 2003). Die neue DIN EN ISO 9308-1:2014-12 (Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien - Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für Wässer mit niedriger Begleitflora) beinhaltet die Verwendung eines chromogenen Agars an Stelle von TTC (ANON. 2014b).

Brilliance™ Salmonella Agar

Brilliance™ Salmonella Agar ist ein Selektivmedium zur Isolierung und präsumtiven Identifizierung von *Salmonella* Spezies. Der Agar enthält zwei chromogene Stoffe, die den

Enzymen Caprylat-Esterase und beta-Glukosidase als Substrate dienen. Die Caprylat-Esterase kommt bei allen Salmonellen vor. Sie spaltet das chromogene Substrat wodurch ein unlösliches purpurfarbendes Chromophor entsteht. Darüber hinaus enthält der Agar die sogenannte InhibigenTM Technologie, die das Wachstum von *E. coli*, *Proteus* spp. und Pseudomonaden unterdrückt und die Wiederfindung von Salmonellen verbessert. Gemäß Hersteller wachsen Salmonellen (einschließlich Laktose-positiver Salmonellen) violett-rosa (Abbildung 4) während andere Spezies aus der Familie *Enterobacteriaceae* blau (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) oder farblos (*Citrobacter* sowie andere Bakterien und Hefen) erscheinen. Eingesetzt werden kann *Brilliance*TM Salmonella Agar gemäß ISO 6579:2002+A1:2007-10 (ANON. 2007c) als Medium der Wahl neben XLD Agar (OXOID 2010a). Darüber hinaus wurde die Verwendung des Agar für die Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln sowie Umweltproben auf Salmonellen mittels der sogenannten OXOID Salmonella PreciTMs Methode durch die AFNOR gemäß ISO 16140:2003 vergleichend zur Standardmethode nach EN ISO 6579:2002+A1:2007-10 (ANON. 2007c) validiert (OXOID 2010b).

Xylose Lysin Desoxycholat Agar (XLD Agar)

Beim XLD Agar handelt es sich um einen Nährboden zur Isolierung von Shigellen und Salmonellen aus klinischem Untersuchungsmaterial und Lebensmitteln. Nach DIN EN ISO 6579:2002+A1:2007-10 ist er für den Nachweis von Salmonellen in Lebens- und Futtermitteln vorgegeben (ANON.2007c). Das Prinzip des Nährbodens beruht auf der Xylose-Verwertung, Lysin-Decarboxylierung und Schwefelwasserstoff-Bildung zur Differenzierung von Shigellen und Salmonellen von nichtpathogenen Bakterien. Shigellen können Xylose nicht verwerten und erscheinen als rote, transparente Kolonien. Salmonellen fermentieren Xylose vollständig und decarboxylieren das Lysin. Sie wachsen auf XLD Agar als rote oder gelborange gefärbte, transparente Kolonien auf rotem Nährbodenhintergrund. Mit Ausnahme von H₂S-negativen Salmonellen zeigen sie aufgrund des gebildeten Schwefelwasserstoffes schwarze Koloniezentren (Abbildung 6). *Salmonella* Typhi (Xylose-positive Stämme) wächst in orangefarbenen, leicht opaken Kolonien. Die im Agar eingesetzte Konzentration von Desoxycholat erlaubt die Hemmung von coliformen Bakterien, ohne Shigellen und Salmonellen im Wachstum zu hindern, wodurch dieser Agar zur Untersuchung von Proben mit einer gemischten Flora geeignet ist. Andere *Enterobacteriaceae* wie z.B. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* und *Serratia* spp. bilden gelbe, opake Kolonien auf gelbem Nährbodenhintergrund während *Providencia* spp. ebenfalls als rote, transparente Kolonien erscheinen (OXOID 2003).

Xylose Lactose TergitolTM4 Agar (XLT4 Agar)

XLT4 (Xylose-Lactose-TergitolTM4) Agar ist ein selektives Medium für die Isolierung und Identifizierung von Salmonellen aus klinischen Proben, Umweltmaterialien und

Lebensmitteln und unterscheidet sich durch den Zusatz von TergitolTM4 (Natriumtetradecylsulfat), welches das Wachstum einer unerwünschten Begleitflora inhibiert bzw. reduziert, von anderen Nährböden für Salmonellen. Salmonellen verwerten die im Nährboden enthaltene Xylose unter Säurebildung wodurch sich die Farbe des im Nährboden enthaltenen pH-Indikators von rot nach gelb ändert. Die Fähigkeit der meisten Salmonellen, Thiosulfat zu Hydrogensulfid zu reduzieren, resultiert in einer Schwarzfärbung der Kolonien (Abbildung 5). Bei weiterer Inkubation realkalisiert der Nährboden aufgrund der Lysin-Decarboxylase-Reaktion und die Kolonien erscheinen rot mit schwarz gefärbtem Zentrum. Andere Lysin-Decarboxylase-positive *Enterobacteriaceae* verwerten in der Regel die im Agar enthaltene Laktose oder Saccharose, wodurch die Ansäuerung des Nährbodens aufrechterhalten wird und sie deshalb als gelbe Kolonie wachsen. Enterobakterien, die wie Shigellen weder Laktose fermentieren noch Thiosulfat reduzieren, wachsen als rote Kolonien ohne Schwarzfärbung (OXOID 2003).

Slanetz Bartley Agar

Der Enterokokken-Nährboden nach Slanetz & Bartley wurde für den Nachweis und zur Koloniezahlbestimmung von Enterokokken mittels Membranfiltermethode entwickelt. Die Zusammensetzung dieses Nährbodens entspricht der, nach Trinkwasserverordnung 2001 (ANON. 2013b) vorgegebenen, DIN EN ISO 7899-2:2000-11 (ANON. 2000). Bedingt durch eine gute Nährstoffgrundlage und der weitgehenden Hemmung der Begleitflora durch das enthaltene Natriumazid weist Slanetz-Bartley Nährboden eine hohe Selektivität für Enterokokken auf. Als Indikator für Enterokokken dient Triphenyltetrazoliumchlorid, welches von den Enterokokken zu einem unlöslichen roten Farbstoff reduziert wird (Abbildung 7) (HEIPHA 2010). Laut Hersteller werden alle roten, rotbraunen oder rosa Kolonien als präsumtive Enterokokken angesehen. Nicht alle Spezies können Triphenyltetrazoliumchlorid reduzieren, weshalb auch blasse Kolonien weiter differenziert werden müssen (OXOID 2003).

Enterococcus Selektivagar Agar

Der Enterococcus Selektivagar dient zur Isolierung, präsumtiven Identifizierung und Keimzahlbestimmung von Enterokokken (fäkalen Streptokokken der Lancefield Gruppe D). Bakterien dieser Gruppe spalten das im Agar enthaltene Äsculin zu Äsculetin und Glukose. Die Bildung eines Äsculetin-Eisen(III)ammoniumcitrat-Komplexes führt zur Ausbildung eines charakteristischen, braun-schwarzen bis schwarzen Hofes um die kleine Kolonie (Abbildung 7). Natriumazid unterdrückt die gramnegative Begleitflora während Galle das Wachstum anderer grampositiver Bakterien inhibiert. Deshalb erscheinen Staphylokokken und Mikrokokken als große Kolonien ohne Hof, Corynebakterien und *Candida* Spezies als kleine

bis große Kolonien ohne Hof und Listerien als unregelmäßig große, opake Kolonien mit braun-schwarzem bis schwarzem Hof (OXOID 2003).

Brilliance™ ESBL Agar

Brilliance™ ESBL Agar ist ein Selektivmedium zum Screening von klinischen Proben auf die Anwesenheit von ESBL-bildenden Bakterien. Dieser chromogene Nährboden basiert ebenfalls auf dem Nachweis der Aktivität von β -Galactosidase und β -Glucoronidase. Er enthält Cefpodoxim in Kombination mit weiteren antibakteriellen Substanzen um *Enterobacteriaceae* zu hemmen, die keine ESBL bilden. Zusätzlich wird das Wachstum der meisten AmpC β -Laktamasen-bildenden Bakterien und weiterer Begleitflora unterdrückt. Der Zusatz von zwei chromogenen Substanzen ermöglicht eine Differenzierung der am meisten verbreiteten ESBL-bildenden Bakterien. Vertreter der sogenannten KESC-Gruppe (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) wachsen grün, während *E. coli* blau-türkise Kolonien bildet (Abbildungen 9 und 10). *Proteus*, *Morganella* und *Providencia* wachsen als gelbbraune Kolonien umgeben von einer braunen Zone. Farblose Kolonien verweisen auf *Salmonella*, *Acinetobacter* und weitere Bakterien mit anderen Resistenzmechanismen (OXOID 2003).

Tryptose Sulphit Cycloserin (TSC) Agar

Dieser Agar dient zur vorläufigen Identifizierung und Koloniezahlbestimmung von *C. perfringens* und anderer Sulfid-reduzierender Clostridien aus Lebensmitteln und anderem Material. Er wird in der EN ISO 7937:2004-11 (ANON. 2004b) für die Koloniezahlbestimmung von *C. perfringens* mittels Plattengussverfahren vorgegeben. Natriumdisulfit und Eisen(III)Ammoniumcitrat zeigen die Sulfid-Reduktion von *C. perfringens* durch eine Schwarzfärbung der Kolonie an (Abbildung 11). Die Lecithinase-Aktivität von einigen *C. perfringens*-Stämmen kann zu einem opaken Hof um die Kolonien führen. Deshalb sollten Lecithinase-positive schwarze Kolonien und Lecithinase-negative schwarze Kolonien als vermutliche *C. perfringens* betrachtet und bestätigt werden. Durch das enthaltene D-Cycloserin wird die Begleitflora gehemmt. Der Agar wurde nach der Oberflächenbeimpfung mit eigelbfreier TSC Agarbasis überschichtet (OXOID 2003).

Membran Clostridium Perfringens Selektivnährboden (mCP Agar)

mCP-Agar wurde als ein Nährboden zur schnellen quantitativen Erfassung von *C. perfringens* in Meer-, Trink- und Abwasser beschrieben (BISSON und CABELLI, 1979). In diesem Selektivnährboden wird das Fehlen der β -D-Glucosidase, die Saccharose-Fermentation sowie die Bildung einer sauren Phosphatase zur Differenzierung präsumtiver *C. perfringens* von anderen Clostridien genutzt. Das Wachstum der Begleitflora wird durch D-Cycloserin und Polymyxin B unterdrückt. *C. perfringens* wächst in charakteristischen opak-gelben Kolonien.

Andere *Clostridium* spp. bilden hingegen purpurne oder blau-grüne Kolonien. Zur Bestätigung von *C. perfringens* empfiehlt der Hersteller eine Bedampfung des bewachsenen Nährbodens mit Ammoniumhydroxid für 20 bis 30 Sekunden, was zu einer Verfärbung nach rosa oder rot durch Spaltung von Phenolphthalein-Diphosphat durch die saure Phosphatase von *C. perfringens* führt (OXOID 2003).

Eigelb Laktose Agar

Beim Eigelb Laktose Agar handelt es sich um einen Nährboden zur Isolierung von Clostridien und deren präsumtiven Identifizierung. Laktose-negative Clostridien wachsen weißlich-violett, Laktose-positive Clostridien (*C. perfringens*) als gelbe Kolonien. Lecithinase-Aktivität (z.B. *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sordellii*) wird durch ein getrübbes Präzipitat um die Kolonie oder unter der Kolonie angezeigt. Bei *C. botulinum* und *C. sporogenes* führt die Lipase-Aktivität zu einer perlmuttartig iridisierenden Zone am Rand der Kolonie. Nach Angaben von SCHNEIDER (2013) ist dieser Agar für die Detektion von *C. botulinum* geeignet. MESSELHÄUSER et al. (2007) geben an, dass der Vorteil dieses Agars darin liegt, dass *C. botulinum* auf diesen Platten nur in eingeschränktem Maße schwärmen kann und so eine Keimzahlbestimmung einfacher durchführbar ist.

Trypticase Pepton Yeast Glucose Bouillon (TPYG-Bouillon)

Die TPYG-Bouillon ist ein Flüssigmedium für Clostridien. Für dieses Nährmedium ist in der Literatur eine Vielzahl von Zusätzen beschrieben, unter anderem Glukose, Hefeextrakt, Tryptikase oder Caseinhydrolysat (BISPING und AMTSBERG 1988). Die TPYG-Bouillon enthält neben anderen Bestandteilen Tryptikase (Trypton/Pepton aus Casein pankreatisch verdaut, Pepton (aus Fleisch, peptisch verdaut), Hefeextrakt und Glukose (s. 3.1.2) und wird als flüssiger Nährboden, Anreicherungsmedium oder Sporulationsmedium für *C. botulinum* verwendet (HILL et al. 2010; SCHNEIDER 2013). Eine zweifache Anreicherung in TPYG-Bouillon mit Zusatz von Trypsin erzielte sehr gute Ergebnisse für *C. botulinum* Typ A, B, E und F (MESSELHÄUSER et al. 2007).

3.2.2 Etablierung und Standardisierung der kulturell-mikrobiologischen Nachweismethoden (qualitativ und quantitativ) mit definierten Keimzahlen

Aufgrund der in der Leistungsbeschreibung des Projektes vorgegebenen Indikatorkeime (siehe 2.4) wurde eine Vorauswahl an Nährmedien für die Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten getroffen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vorauswahl der Nährmedien für die Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten

Keim	Nährmedium
<i>E. coli</i> , coliforme Keime	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Brilliance</i>TM <i>E. coli</i>/Coliform Selektiv Agar • Tergitol 7 Lactose TTC Agar
Salmonellen	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Brilliance</i>TM Salmonella Agar • XLD Agar • XLT4 Agar
Enterokokken	<ul style="list-style-type: none"> • Slanetz Bartley Agar • Enterococcus Selektivagar
ESBL-bildende <i>Enterobacteriaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Brilliance</i>TM ESBL Agar
<i>C. perfringens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tryptose Sulphit Cycloserin Agar, überschichtet mit TSC Agar Basis • Membran Clostridium Perfringens (mCP) Selektivnährboden
<i>C. botulinum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Eigelb Laktose Agar • TPYG-Bouillon

Die Auswahl der Bakterienstämme orientierte sich an der Vorgabe der Qualitätskontrollen (Prüfkeime) für ein spezifisches Nährmedium gemäß Hersteller. Diese Prüfkeime wurden, sofern möglich, über die DSMZ als Lyophilisat bezogen. Folgende DSMZ-Stämme wurden für die Versuche gemäß Herstellervorgabe in 5 ml Nährbouillon rekonstituiert:

- *E. coli* (DSM 1103)
- *S. Typhimurium* (ATCC 14028)
- *S. Enteritidis* (DSM 14221)
- *E. faecalis* (ATCC 29212)
- *Klebsiella pneumoniae* SHV-18 (ATCC 700603)
- *C. perfringens* (DSM 756)

Für den *Brilliance*TM ESBL Agar wurden *E. coli* mit dem Enzym-Typ CTX-M (Cefotaxim-resistent, Typ München) ausgesucht. Die Typen CTX-M-1 und CTX-M-15 treten in Deutschland treten am häufigsten auf (ELLER et al. 2013; LEISTNER et al. 2014).

Für jeden Stamm erfolgte direkt im Anschluss das Überimpfen auf je 1 Platte Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS} (5% Schafblut). Nach 24 h Bebrütung bei 37°C (aerob, anaerob) wurde die Reinheit der Kultur sowie das phänotypische Wachstum der Bakterien überprüft.

Die o.g. Stämme sowie *E. coli* 003-13-2 (CTX-M 15 TEM, Feldisolat), *E. coli* 0010-73-1 (CTX-M 1, Feldisolat), *C. perfringens* (Feldisolat) und *C. botulinum* Typ B BC 36/06 (REB 1931) wurden auf die spezifisch ausgewählten, zu testenden Agarplatten (siehe Tabelle 1) überimpft, gemäß Herstellerangaben inkubiert und kontrolliert, ob das Wachstum den Herstellerangaben entsprach. Von allen Testkeimen wurde eine Stammsammlung im Mikrobank[®]-System angelegt und bei -80°C weggefroren.

3.2.2.1 Herstellung einer Testkeimsuspension

Die Herstellung der Testkeimsuspension erfolgte in Anlehnung an Teil 1: Validierung mit vegetativen Bakterien: Project Horizontal des CEN BT/TF 151 – WP3 Part I, Annex H (ANON. 2007b). Zunächst wurde überprüft, ob diese Methode für alle Indikatorkeime praktikabel ist und die notwendige Ausgangs-Keimmenge (ca. 10^7 KbE/ml) erzielt wird. 48 h vor Versuchsbeginn wurde eine frische Subkultur des zu testenden Bakteriums auf Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS} angefertigt und für 24 h bei 37°C aerob bzw. anaerob (AnaeroJarTM 2,5 l, AnaeroGenTM 2,5 l) bebrütet. Von dieser Kultur wurde nach 24 h mittels einer Impföse eine Kolonie entnommen und in 10 ml Nährbouillon übertragen. Im Fall von *C. botulinum* wurde die Nährbouillon vor der Verwendung mehrfach aufgeköcht und dann abgekühlt, um den Sauerstoffgehalt in der Bouillon zu reduzieren. Die entstandene Suspension wurde mit Hilfe eines Vortex-Mixers gut durchmischt und für 24 Stunden bei 37°C aerob bzw. anaerob bebrütet.

Aus jeder Testkeimsuspension wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe (1 ml Testkeimsuspension + 9 ml Nährbouillon) bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 100 µl im Doppelansatz auf Standard-Nähragar I-Platten ausgespatelt und bei 37°C für 48 h (aerob/anaerob) inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und nach 48 h die Anzahl an Kolonie-bildenden Einheiten (KbE)/ml berechnet.

3.2.2.2 Berechnung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter

Zur Berechnung der Lebendkeimzahl wurde folgende Formel herangezogen:

$$\text{KbE/ml} = \Sigma c / (n \times d \times v)$$

- Σc = die Summe aller ausgezählten Kolonien der ausgewählten Verdünnungsstufe
- n = Anzahl der ausgezählten Platten der ausgewählten Verdünnungsstufe
- d = Verdünnungsstufe, die ausgewählt wurde
- v = Volumen, das ausgespatelt wurde (0,1 ml)

3.2.2.3 Aufbereitung der Matrix „Gärrest“

Für die Etablierung der Nachweismethoden wurde Gärrest aus einer Biogasanlage, die hauptsächlich mit Schweinegülle beschickt wird, als Matrix gewählt. Der Gärrest wurde in einer Weithalsdose ohne Deckel bei 121°C für 60 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen

wurde eine Sterilitätskontrolle durchgeführt. Hierfür wurden mittels Einmal-Impföse (10 µl) mehrere Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS}-Platten mit autoklaviertem Gärrest beimpft und bei 37°C für 24 h aerob/anaerob bebrütet. Dieses Vorgehen wurde mehrfach wiederholt bis kein Keimwachstum mehr nachweisbar war.

Anschließend erfolgte die Beimpfung der Matrix mit den Testkeimen in fünf definierten Keimmengen:

- 10^7 KbE/ml
- 10^2 KbE/ml
- 10^1 KbE/ml
- 10^0 KbE/ml
- 10^{-1} KbE/ml

Die Keimmengen wurden so gewählt, dass eine eindeutige Wiederfindung möglich war, aber auch Mengen im Bereich der Nachweisgrenze (=1 KbE/Platte) bzw. darunter eingesetzt wurden.

10 ml beimpfte Matrix wurden mit 90 ml steriler Nährbouillon aufgefüllt und für 60 Sekunden im Stomacherbeutel (Laboratory Blender Stomacher 400, Einstellungen: normale Geschwindigkeit, 60 Sekunden) durchmischt. Im Anschluss daran wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe in Nährbouillon hergestellt, und von jeder Verdünnungsstufe wurden je 100 µl im Doppelansatz auf die in Tabelle 1 aufgeführten Nährmedien ausgespatelt. Nach einer Bebrütung von 48 h bei 37°C (aerob/anaerob) wurden die KbE/ml berechnet (siehe 3.2.2.2). Bei der Berechnung wurde zusätzlich zur vorangehend aufgeführten Formel die 1:10 Verdünnung der beimpften Matrix durch das Aufschwemmen in Nährbouillon einbezogen. Für jedes Nährmedium wurden drei voneinander unabhängige Versuchsdurchgänge durchgeführt.

3.2.3 Probitanalyse

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurden die folgenden Keimmengen der Testkeime auf den jeweiligen Nährmedien in drei Versuchsdurchläufen getestet:

- 10^7 KbE/ml
- 10^2 KbE/ml
- 10^1 KbE/ml
- 10^0 KbE/ml
- 10^{-1} KbE/ml

Die Berechnung der analytischen Sensitivität zur Festlegung der unteren Nachweisgrenze wurde mit dem Statistikprogramm „R“ Version 3.0.2 (R Development Core Team, 2014)

durchgeführt. Das 95%-Detektionslimit wurde mittels der „dose.p function“ der MASS Anwendung nach VENABLES und RIPLEY (2002) kalkuliert.

3.2.4 Überprüfung der ausgewählten Nährmedien an Gärresten und Gärsubstraten aus Biogasanlagen im Freistaat Sachsen

Basierend auf den Ergebnissen der Probitanalyse sowie der Handhabung der Nährmedien beim Anlegen der zu untersuchenden Proben wurde ausgewählt, welcher Agar für die Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten verwendet werden sollte. Mit der Untersuchung von Feldproben wurden die ausgewählten und etablierten Untersuchungsmethoden auf ihre Praxistauglichkeit getestet.

3.2.4.1 Beschreibung der Pilotbetriebe

An der Studie nahmen zehn Pilotbetriebe teil. Alle zehn Pilotbetriebe befinden sich im Freistaat Sachsen und haben sich freiwillig für dieses Projekt gemeldet.

Aus Gründen des Datenschutzes wurden alle Pilotbetriebe (PB) randomisiert durchnummeriert, so dass sich die Benennung PB 1 bis PB 10 ergibt. Da von Betrieb PB 9 zwei Biogasanlagen an zwei unterschiedlichen Standorten beprobt wurden, werden diese in PB 9a und PB 9b unterschieden. PB 1 konnte im Projektverlauf aus technischen Gründen nicht beprobt werden und wurde nicht in die Studie einbezogen. Aus Gründen des Datenschutzes werden die PB hier nur allgemein beschrieben, so dass keine Rückschlüsse auf einen der Betriebe gezogen werden können.

Die Inbetriebnahme der Biogasanlagen der PB erfolgte in den Jahren 2002 bis 2011. Drei der Biogasanlagen wurden vor 2004 in Betrieb genommen, in den Jahren 2004 bis 2010 erfolgte die Inbetriebnahme von sechs der BGA und eine Anlage wurde nach 2010 in Betrieb genommen. Drei der Biogasanlagen hatten eine bzw. zwei Hydrolysestufen (zur Aufbereitung der Biogassubstrate) vor dem Fermentationsprozess installiert. Eine Anlage verfügte über einen thermophilen Nachgärer. Zwei der Biogasanlagen besaßen mehr als ein Endlager für die Gärreste. Im Hinblick auf die Gärsubstrate machte Gülle (Rinder- und Schweinegülle, andere Gülle und Hühnertrockenkot) bei allen Anlagen den größten Anteil der Substrate aus. Lediglich eine BGA hatte einen Gülleanteil von weniger als 70% in ihrem Gärsubstrat. Sechs von zehn Biogasanlagen hatten einen Gülleanteil von 70 bis 90%, bei drei Anlagen lag der Anteil der Gülle über 90%. Acht der zehn Biogasanlagen setzten Rindergülle und Rindermist ein, eine Anlage fütterte hauptsächlich Schweinegülle und eine weitere BGA verwendete ein Gemisch aus Gülle verschiedener Tierarten. Der Anteil an nachwachsenden Rohstoffen lag bei drei Anlagen über 20%, bei sieben von zehn BGA waren es 20% oder weniger. Des Weiteren verwendete ein PB Rezyclat im Biogasprozess, d.h. hier wird ein Teil der Gärreste dem Biogasprozess als Gärsubstrat erneut zugeführt.

3.2.4.2 Probenentnahme, Transport, Lagerung

Die Probenentnahme erfolgte durch einen Mitarbeiter des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen. Die Anlagenbetreiber wurden im Vorfeld gebeten die Kompartimente aus denen die Proben gewonnen werden sollten (z.B. Fermenter) nach Möglichkeit mindestens eine ½ Stunde vor Probenentnahme auf zu rühren. Dieses war nicht in allen Anlagen möglich, da die Gärresteendlager zum Teil erst vor der Ausbringung der Gärreste zur Düngung aufgerührt werden. Die Probenentnahme richtete sich nach den örtlichen baulichen Gegebenheiten. Wenn vorhanden, wurden die Proben aus einem Probenentnahmehahn entnommen. Hierbei wurden die ersten 20 l Probe aus dem Hahn verworfen, danach ca. 1 – 3 l Probe in ein steriles Weithalsgefäß abgefüllt und dieses locker verschlossen. War kein Probenentnahmehahn vorhanden, wurde die Probe mit einem Jaucheschöpfer entnommen. Da die baulichen Gegebenheiten in den verschiedenen Biogasanlagen zum Teil stark voneinander abweichend waren, konnten nicht bei allen Anlagen Proben aus den gleichen Kompartimenten genommen werden. In Abbildung 3 ist beispielhaft dargestellt, wo die Probenentnahme in einer Biogasanlage möglich ist.

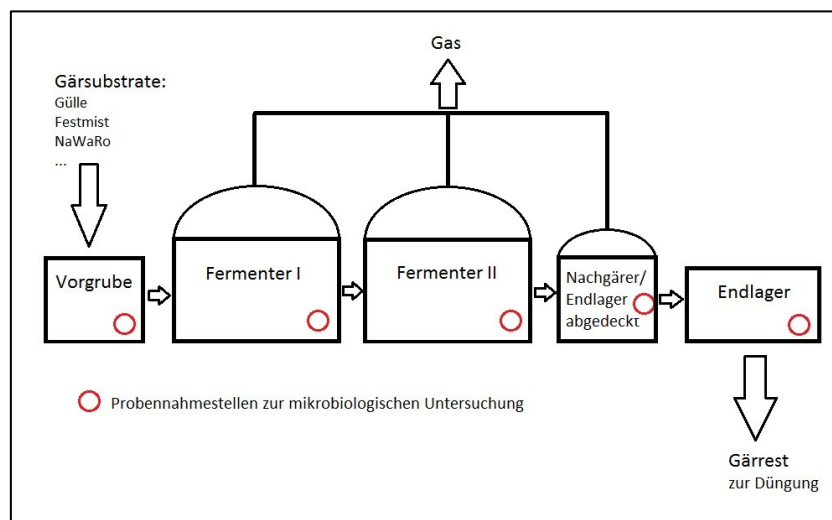


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Biogasanlage mit Probenentnahmestellen

In der folgenden Übersicht (Tabelle 2) ist aufgeführt, aus welchem Bereich der Biogasanlage im jeweiligen PB die Proben entnommen wurden.

Tabelle 2: Probenentnahmestellen in den Pilotbetrieben

Pilotbetrieb	Probenentnahmestelle
PB 2	Fermenter I, Fermenter II, Nachgärer
PB 3	Fermenter, Nachgärer
PB 4	Vorgrube, Fermenter, Nachgärer, Endlager
PB 5	Vorgrube, Fermenter, Nachgärer
PB 6	Fermenter, Nachgärer, Endlager I, Endlager II

Pilotbetrieb	Probenentnahmestelle
PB 7	Fermenter, Endlager
PB 8	Fermenter I, Fermenter II
PB 9a	Hydrolyse 1, Hydrolyse 2, Fermenter I, Fermenter II
PB 9b	Hydrolyse, Fermenter
PB 10	Vorgrube, Fermenter 1, Fermenter 2, Nachgärer

Der Transport erfolgte in sterilen Weithalsgefäßen mit Schraubdeckel, ungekühlt, da eine Zeitspanne von maximal 3 h bis zur Untersuchung im Labor eingehalten wurde.

Die Untersuchung der entnommen Proben erfolgte jeweils am selben Tag. Nach der Untersuchung wurden von jeder Probe 2 x 50 ml als Rückstellprobe bei -80°C weggefroren. Die restliche Probenmenge wurde gekühlt bei 7°C gelagert, bis die Auswertung der Untersuchungen abgeschlossen war.

3.2.4.3 Bakteriologische Untersuchung der Gärreste und Gärsubstrate

Die Proben wurden im Probenentnahmegefäß mit einer sterilen 25 ml Einmal-Pipette gut durchmischt. Von jeder Probe wurden mit einem sterilen Löffel je 10 g in ein steriles Becherglas sowie einen sterilen Stomacherbeutel abgewogen. Waren mehrere Proben aus einem Kompartiment entnommen worden, wurden diese in einem sterilen Behälter miteinander gemischt und eine Sammelprobe untersucht. Im nächsten Schritt wurden der Probe im Stomacherbeutel 90 ml sterile Nährbouillon zugesetzt und diese Mischung im Stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400, Einstellung: normale Geschwindigkeit) für 60 Sekunden gründlich durchmischt. Die Probe im Becherglas wurde für 15 Minuten bei 65°C im Wasserbad erhitzt und danach für den Nachweis von *C. perfringens* und *C. botulinum* verwendet.

Von der im Stomacherbeutel durchgemischten Probe wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe in Nährbouillon bis zu der Verdünnungsstufe 10^{-6} hergestellt. Im Doppelansatz wurden je 100 µl der Probe aus dem Stomacherbeutel sowie der Verdünnungsstufen auf die zuvor ausgewählten Selektivnährmedien sowie auf Standard-Nähragar I zur Bestimmung der aeroben Koloniezahl aufgebracht und ausgespatelt. Die Agarplatten wurden bei 37°C für 48 h, bzw. im Falle des Slanetz Bartley Agars für 72 h aerob bebrütet. Nach 24 h und 48 h bzw. 48 h und 72 h (Slanetz Bartley Agar) wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und dokumentiert und die Keimzahl in KbE/ml berechnet.

Nach der Erhitzung der Probe im Wasserbad wurden 2x 5 ml TPYG-Bouillon mit je 500 µl Probe beimpft. Vor der Beimpfung erfolgte das Aufkochen der TPYG-Bouillon für 15 Minuten im Wasserbad. Die Inkubation der beimpften Bouillon erfolgte unter anaeroben

Bedingungen (AnaeroJar™ 2,5 I, AnaeroGen™ 2,5 I) für fünf Tage bei 37°C. Danach wurden die Anreicherungen für die Aufreinigung von DNA und anschließende Untersuchung mittels PCR bei -80°C gelagert.

Aus der im Wasserbad erhitzten Probe wurde außerdem eine 1:10-Verdünnungsreihe in Nährbouillon bis zu der Verdünnungsstufe 10^{-4} hergestellt. Im Doppelansatz wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen auf TSC Agar sowie Eigelb Laktose Agar aufgebracht und ausgespatelt. Die Agarplatten wurden vorab für 48 h unter anaeroben Bedingungen (AnaeroJar™ 2,5 I, AnaeroGen™ 2,5 I) gelagert. Der TSC Agar wurde im Anschluss mit eigelbfreier TSC Agarbasis überschichtet. Unter anaeroben Bedingungen wurde bei 37°C für 48 h (TSC Agar) bzw. 72 h (Eigelb Laktose Agar) inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurden die gewachsenen Kolonien auf TSC Agar ausgezählt und dokumentiert. Die Auswertung des Eigelb Laktose Agars erfolgte nach 48 h und 72 h.

Spezies-Differenzierung bei Verdacht auf ESBL-bildende *Enterobacteriaceae*

Wurden auf dem *Brilliance*™ ESBL Agar verdächtige Kolonien gefunden, so wurde von jeder phänotypisch unterschiedlichen Kolonie je eine Subkultur auf Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS} (5 % Schafblut), Gassner Nährboden und *Brilliance*™ ESBL Agar angefertigt. Die Identifizierung der Spezies erfolgte anhand der Koloniemorphologie und des typischen Wachstums auf den Nährmedien, der Färbung nach Gram, der Katalase-, Oxidase- und Indolreaktion sowie mittels des kommerziell erhältlichen *RapID*™ ONE Kits nach Herstellerangaben.

Phänotypische Bestätigung der ESBL-Bildung

Die phänotypische Bestätigung der Fähigkeit zur ESBL-Bildung erfolgte mittels der Micronaut-S β-Lactamase VII Testplatte (Merlin Diagnostika). Hierzu wurde zunächst von allen fraglichen Isolaten eine frische Subkultur auf Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS} (5 % Schafblut) angelegt und für 24 h bei 37°C aerob bebrütet. Am nächsten Tag wurden von jeder Kultur entsprechend viele Kolonien in 5 ml NaCl (0,9%) übertragen und homogenisiert, bis die Trübung gemäß Herstellerangaben einem McFarland Standard von 0,5 entsprach. 50 µl dieser Bakteriensuspension wurden in 11 ml Mueller-Hinton II Bouillon pipettiert und mittels Vortex-Mixer eine homogene Suspension hergestellt. Jede Vertiefung der Micronaut-S β-Lactamase VII Testplatte wurde mit 100 µl der Suspension beimpft. Anschließend wurden die Platten mit einer nicht-perforierten Abklebefolie verschlossen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch visuelles Ablesen erfolgte nach den vom Hersteller vorgegebenen Kriterien. Die Ergebnisse wurden auf einem Plattenbelegungsplan dokumentiert.

Identifizierung *Salmonella*-verdächtiger Kolonien

Wurden auf dem *Brilliance*™ *Salmonella* Agar verdächtige Kolonien gezählt, wurde von jeder phänotypisch unterschiedlichen Kolonie je eine Subkultur auf Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS} (5 % Schafblut), Gassner Nährboden und *Brilliance*™ *Salmonella* Agar angefertigt. Die Identifizierung der Spezies erfolgte anhand der Koloniemorphologie und des typischen Wachstums auf den Nährmedien, der Färbung nach Gram, der Katalase-, Oxidase- und Indolreaktion sowie mittels des kommerziell erhältlichen RapID™ ONE Kits nach Herstellervorgaben.

Differenzierung von Clostridien

Wurden auf dem Eigelb Laktose Agar Clostridien-verdächtige Kolonien gefunden, so wurde von diesen je eine Subkultur auf Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS} (5 % Schafblut) hergestellt. Zusätzlich wurde eine aerobe Wachstumskontrolle angelegt. Die Identifizierung der Spezies erfolgte anhand der Koloniemorphologie und des typischen Wachstums, der Färbung nach Gram sowie mittels des kommerziell erhältlichen RapID™ ONE Kits nach den Vorgaben des Herstellers. Nach der Identifizierung von *C. perfringens* wurde zur Toxin-Gen-Bestimmung mittels PCR Koloniematerial in PBS bei -80°C eingefroren.

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von *C. perfringens* und *C. botulinum*

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem spezifische Nukleinsäuresequenzen exponentiell vermehrt (amplifiziert) werden. Diese lassen sich mittels Gelelektrophorese im elektrischen Feld auftrennen und durch einen fluoreszierenden, mit der amplifizierten DNA interkalierenden Farbstoff sichtbar machen (konventionelle PCR). Eine andere Möglichkeit ist die sogenannte real-time PCR. Bei dieser wird eine Farbstoff-markierte Sonde direkt an die amplifizierten Sequenzen gebunden und mit ansteigender Menge der Amplifikate nimmt die Fluoreszenz proportional zu, welche dann während der PCR in Echtzeit (= real time) gemessen wird. Eine PCR besteht i.d.R. aus drei Schritten, die aufeinander folgen und zyklisch wiederholt werden. Die erste Phase ist die Denaturierung, in welcher die doppelsträngige DNA sich durch das Einwirken einer Temperatur von 94-96°C in zwei Einzelstränge aufteilt. Es folgt die Phase der Primerhybridisierung (Annealingphase), in der sich die spezifischen Primer an die gesuchte Nukleotidsequenz der DNA-Einzelstränge anlagern. Anschließend werden in der Elongation oder Amplifikation durch eine DNA-Polymerase die Lücken zwischen den Primern aufgefüllt, so dass wieder eine doppelsträngige DNA entsteht. Somit wird die Anzahl der Kopien im ersten Zyklus verdoppelt, in den nachfolgenden Zyklen steigt die Zahl der Kopien exponentiell an, da die amplifizierten Produkte wieder als Matrize zur Verfügung stehen.

3.2.5.1 Aufbereitung der Proben für die PCR

Die Aufreinigung der DNA für die Etablierung und Standardisierung der PCR-Verfahren erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Kit der Firma Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers (s. Anhang 9.1.1). Die Aufreinigung von DNA aus grampositiven Bakterien erfolgte von allen mittels RapID™ ANA II bestätigten Isolaten von *C. perfringens* sowie *C. sordellii*, *C. subterminale*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* und *C. difficile*. Im Vorfeld wurde eine Bakterien-Suspension in PBS hergestellt. Hierzu wurden zunächst 500 µl PBS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, dann mit einem trockenen Wattetupfer einige Kolonien der entsprechenden Reinkultur aufgenommen und der Tupfer im Reaktionsgefäß ausgespült. Anschließend wurde mit 500 µl PBS aufgefüllt. Die Bakterien-Suspensionen wurden bis zur Aufreinigung bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurde zu jeder Aufreinigung eine Aufreinigungskontrolle mitgeführt. Hier wurde anstelle des Probenmaterials PBS verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Nachweis von *Clostridium perfringens* Toxin-Genen

Der molekularbiologische Nachweis von *C. perfringens* Toxin-Genen erfolgte mittels konventioneller Multiplex-PCR nach dem Protokoll von VAN ASTEN et al. (2009). Bei einem Multiplex-PCR-Verfahren wird eine Probe mit Hilfe verschiedener Primerpaare parallel auf unterschiedliche Zielsequenzen, in diesem Fall Toxin-Gene, untersucht. Tabelle 3 enthält die verwendeten Primer.

Tabelle 3: Spezifische Oligonukleotid-Primer für die PCR nach Van Asten et al. (2009)

Toxin-Gen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' – 3'	Amplifikatgröße
<i>cpa</i> , α-Toxin	CPAlphaF	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324 bp
	CPAlphaR	CCTCTGATACATCGTGTAAG	
<i>cpb</i> , β-Toxin	CPBetaF3	GCGAATATGCTGAATCATCTA	195 bp
	CPBetaR3	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	
<i>cpb2</i> , β ₂ -Toxin	CPBeta2totalF2	AAATATGATCCTAACCAAM ¹ aAA	548 bp
	CPBeta2totalR	CCAAATACTY ¹ bTAATY ² GATGC	
<i>etx</i> , ε-Toxin	CPEpsilonF	TGGGAAGTTCGATACAAGCA	376 bp
	CPEpsilonR2	AACTGCACTATAATTTCTTTTCC	
<i>iap</i> , ι-Toxin	CPlotaF2	AATGGTCCTTTAAATAATCC	272 bp
	CplotaR	TTAGCAAATGCACTCATATT	
<i>cpe</i> , Enterotoxin	CPEnterof	TTCAGTTGGATTTACTTCTG	485 bp
	CPEnteror	TGTCCAGTAGCTGTAATTGT	

¹ M = A oder C

² Y = C oder T

Für den Mastermix wurden alle Komponenten des Reaktionsansatzes (Tabelle 4) entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben (plus 10%) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mittels Vortex-Mixers gemischt und in einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Anschließend wurden pro Probe 22,5 µl Mastermix und 2,5 µl aufgereinigte DNA in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstatt der aufgereinigten DNA 2,5 µl PCR-Wasser enthielt. Bei jeder PCR wurden Referenzstämme als Positivkontrollen mitgeführt. Diese sind in Tabelle 5 aufgelistet. Zusätzlich wurde DNA von *C. sordellii*, *C. subterminale*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* und *C. difficile* zur Überprüfung der Spezifität der Primer in die PCR eingesetzt.

Tabelle 4: Mastermix für die *C. perfringens* Toxin-Gen PCR

Reagenz, Primer	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion
H ₂ O (PCR Wasser)		4,00 µl
Qiagen Multiplex PCR Master Mix		12,50 µl
CPAlphaF	0,20 µM	0,50 µl
CPAlphaR	0,20 µM	0,50 µl
CPEpsilonF	0,20 µM	0,50 µl
CPEpsilonR2	0,20 µM	0,50 µl
CPlotaF2	0,20 µM	0,50 µl
CplotaR	0,20 µM	0,50 µl
CPEnterof	0,20 µM	0,50 µl
CPEnteror	0,20 µM	0,50 µl
CPBeta2totalF2	0,40 µM	0,50 µl
CPBeta2totalR	0,40 µM	0,50 µl
CPBetaF3	0,20 µM	0,50 µl
CPBetaR3	0,20 µM	0,50 µl
Gesamtvolumen:		22,5 µl

Tabelle 5: Positivkontrollen für die *C. perfringens* Toxin-Gen PCR

Bakterium	Toxin-Gen	Amplifikatgröße
<i>C. perfringens</i> Typ A (DSM 756)	<i>cpa</i>	324 bp
	<i>cpb2</i>	548 bp
<i>C. perfringens</i> Typ B (ATCC 3626)	<i>cpa</i>	324 bp
	<i>cpb</i>	195 bp
	<i>etx</i>	376 bp
	<i>cpb2</i>	548 bp

Bakterium	Toxin-Gen	Amplifikatgröße
<i>C. perfringens</i> Typ C (NCTC 3180)	<i>cpa</i>	324 bp
	<i>cpb</i>	195 bp
<i>C. perfringens</i> Typ D (NCTC 8504)	<i>cpa</i>	324 bp
	<i>etx</i>	376 bp
<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	<i>cpa</i>	324 bp
	<i>cpe</i>	485 bp
	<i>cpb2</i>	548 bp
	<i>iap</i>	272 bp

Die PCR erfolgte im Thermocycler Biometra® Tprofessional nach folgendem Temperatur-Zeit-Profil (Tabelle 6):

Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Profil der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Amplifikation			40
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	53°C	90 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Kühlen	10°C	∞	

Für den Einsatz von DNA, die aus nativem Gärrest gewonnen wurde, wurde zur Optimierung des PCR-Verfahrens ein touch-down Protokoll mit erhöhter Stringenz in den Amplifikationsbedingungen eingesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Touch-down Protokoll für die *C. perfringens* Toxin-Gen PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Amplifikation			
Denaturierung	94°C	30 sec	4
Annealing	60°C	90 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Denaturierung	94°C	30 sec	2
Annealing	58°C	90 sec	
Elongation	72°C	90 sec	

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	2
Annealing	56°C	90 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Denaturierung	94°C	30 sec	2
Annealing	54°C	90 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Denaturierung	94°C	30 sec	35
Annealing	53°C	90 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Halten bei	72°C	10 min	

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels der in 3.2.5.4 beschriebenen Gelelektrophorese in einem Agarosegel (3%) gefärbt mit 5 µl HDGreen™ Plus/100 ml Agar. Für die qualitative Größenbestimmung der Amplifikate wurde der DNA-Marker GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use von Thermo Scientific gemäß Vorgabe des Herstellers eingesetzt.

3.2.5.3 Nachweis von *Clostridium botulinum*

Der Nachweis von toxinbildenden *C. botulinum* erfolgte nach dem Protokoll von HILL et al. (2010). Hierbei wurde zunächst eine konventionelle PCR zum Nachweis des NTNH-Gens (nontoxin-nonhemagglutinin, *ntnh*) durchgeführt und somit auf das Vorhandensein toxinbildender *C. botulinum* unabhängig von ihrem Toxintyp untersucht. Im Anschluss daran erfolgt der Nachweis der spezifischen Neurotoxin-kodierenden Gene (*bont*) in einer real-time PCR.

Konventionelle NTNH-Gen PCR

Für diese PCR wurde das Taq PCR Core Kit mit nachfolgenden Primern (Tabelle 8) verwendet.

Tabelle 8: Spezifische Oligonukleotid-Primer für die *C. botulinum* NTNH-Gen PCR

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' – 3'	Amplifikatgröße
NTNH forward	CCHAATATHTGGRTDGCNCC	101 bp
NTNH reverse	RAAAGRAAAYTAGARTCATAWAYTCCHCC	

Y = C oder T; R = A oder G; W = A oder T; H = A, T oder C; D = A, T oder G; N = A, T, G oder C

Für den Mastermix wurden alle Komponenten des Reaktionsansatzes (Tabelle 9) entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben (plus 10%) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mittels Vortex-Mixers gemischt. Anschließend wurden pro Reaktion 22,0 µl Mastermix und 3,0 µl aufgereinigte DNA in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß

gegeben. Es wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstatt der aufgereinigten DNA 3,0 µl PCR-Wasser enthielt. In jedem PCR-Lauf wurde *Clostridium botulinum* Typ A S0174/09 (REB 1472) als Positivkontrolle mitgeführt. Die erwartete Größe des *ntnh*-Amplifikates lag bei 101 bp. Zusätzlich wurde DNA von *C. perfringens* Typ A- E, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. subterminale*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* und *C. difficile* zur Überprüfung der Spezifität der Primer in die PCR eingesetzt. Die PCR erfolgte entsprechend des Temperatur-Zeit-Profiles in Tabelle 10 im Thermocycler Biometra® Tprofessional. Die Auswertung der PCR erfolgte mittels der in 3.2.5.4 beschriebenen Gelelektrophorese in einem Agarosegel 2,5% gefärbt mit 5 µl HDGreen™ Plus/100 ml Gel. Für die qualitative Größenbestimmung der Amplifikate wurde der DNA-Marker GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die *C. botulinum* NTNH-Gen PCR

Reagenz, Primer	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion
H ₂ O (PCR-Wasser)		9,38 µl
10 x Reaction Buffer	1x	2,50 µl
dNTP	0,2 mM	0,50 µl
NTNH forward	1,50 µM	3,75 µl
NTNH reverse	1,50 µM	3,75 µl
Taq Polymerase	2,50 U/Reaktionsansatz	0,125 µl
MgCl ₂	3,50 mM	2,00 µl
Gesamtvolumen		22,00 µl

Tabelle 10: Temperatur-Zeit-Profil der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Amplifikation			35
Denaturierung	94°C	15 sec	
Annealing	57°C	60 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Finale Extension	72°C	10 min	
Kühlen	10°C	∞	

Real-time PCR zum Nachweis der spezifischen Neurotoxin-Gene

Im zweiten Teil des Protokolls nach HILL et al. (2010) werden die in der konventionellen PCR als NTN-H-Gen-positiv detektierten Proben auf die spezifischen Neurotoxin-Gene (*bont A* bis *bont G*) untersucht. Es wurde für jedes Neurotoxin-Gen ein gesonderter Mastermix hergestellt. Die Primer und Sonden hierfür sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze ist den Tabellen 12 und 13 zu entnehmen. Für den Mastermix zum Nachweis der verschiedenen Toxin-Gene wurden alle Komponenten des jeweiligen Reaktionsansatzes entsprechend der berechneten PCR-Reaktionen (plus 10%) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mittels Vortex-Mixers gemischt. Anschließend wurden pro Reaktion 22,0 µl Mastermix und 3,0 µl aufgereinigte DNA in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle mitgeführt, für die anstatt der aufgereinigten DNA 3,0 µl PCR-Wasser verwendet wurden. Bei jeder PCR wurden verschiedene Positivkontrollen mitgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 11: Spezifische Oligonukleotid-Primer und Sonden der *C. botulinum* Neurotoxin-Gen real-time PCR

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' – 3'	Produktgröße
BoNT A Forward	TggTTTTgAggAgTCACTTgAA	227 bp
BoNT A Reverse	TCATgTCCCCCAAATgTTCT	
BoNT A Probe	6FAM-TgCaggCAAATTTgCTACAgATCCA--BHQ1	
BoNT B Forward	CAAgAAAACAAAggCgCAAg	214 bp
BoNT B Reverse	CTgggATCTTgYCCTCCAAA	
BoNT B Probe	6FAM-CgTggATATTTTTCAgATCCAgCCTTg--BHQ1	
BoNT C Forward	CAACTTTAATTATTCAgATCCTgTTgA	181 bp
BoNT C Reverse	ggCTTgTAACTCgAggAggTT	
BoNT C Probe	6FAM-TgAgCCTgAAAAAgCCTTTCgCA--BHQ1	
BoNT D Forward	CCATCATTTgAAgggTTTgg	250 bp
BoNT D Reverse	TgggTCCATCTTgAgARAAA	
BoNT D Probe	6FAM-TCCCTCgCTAACTTgTggACgAATC--BHQ1	
BoNT E Forward	ATAATgggAgCagAgCCTgA	230 bp
BoNT E Reverse	CCCTTTAgCCCCATATAgTCC	
BoNT E Probe	6FAM-TgCCAAgCAATCACggTTTTgg--BHQ1	
BoNT F Forward	gTSAgACAATACCTCAAATATCAAATCg	158 bp
BoNT F Reverse	CTggYACTTTTTgTgCATgT	
BoNT F Probe	6FAM-TgCCAAgATATgATTCTAATggAA--BHQ1	

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' – 3'	Produktgröße
BoNT G Forward	ATCCAACCTggAgCTgAAgA	242 bp
BoNT G Reverse	gCTggATCTgCAAAATACgC	
BoNT G Probe	6FAM-TggCCATTCCCCAATATCAgAAGg--BHQ1	

Tabelle 12: Mastermix für *bont A – E* und *G*

Reagenz	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion
LC DNA Master Hybridization Probes		3,50 µl
H ₂ O (PCR-Wasser)		13,00 µl
Forward Primer	0,5 µM	1,25 µl
Reverse Primer	0,5 µM	1,25 µl
Probe	0,2 µM	0,50 µl
MgCl ₂	2,5 mM	2,50 µl
Gesamtvolumen		22,00 µl

Tabelle 13: Mastermix für *bont F*

Reagenz	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion
LC DNA Master Hybridization Probes		3,50 µl
H ₂ O (PCR-Wasser)		2,50 µl
BoNT F Forward	0,6 µM	1,50 µl
BoNT F Reverse	0,6 µM	1,50 µl
BoNT F Probe	0,2 µM	0,50 µl
MgCl ₂	2,5 mM	2,50 µl
Gesamtvolumen		22,00 µl

Für diesen Mastermix war keine Positivkontrolle vorhanden, er wurde trotzdem zum Austesten einer möglichen Kreuzreaktivität eingesetzt.

Tabelle 14: Positivkontrollen für die real-time *C. botulinum* Neurotoxin-Gen PCR

Referenzstamm	Toxin-Gen
<i>Clostridium botulinum</i> Typ A S0174/09 (REB 1472)	<i>bont A</i> /"silent" <i>bont B</i>
<i>Clostridium botulinum</i> Typ B BC 36/06 (REB 1931)	<i>bont B</i>
<i>Clostridium botulinum</i> Typ C S0028/10 (REB 1455)	<i>bont C</i>
<i>Clostridium botulinum</i> Typ D B-1720-01	<i>bont D</i>

Referenzstamm	Toxin-Gen
<i>Clostridium botulinum</i> Typ E S0187/09 (REB 1718)	<i>bont E</i>
<i>Clostridium botulinum</i> Typ F BC 69/06 (NCTC 10281)	<i>bont F</i>

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer und Sonden bzw. einer möglichen Kreuzreaktivität wurde DNA von *C. perfringens* Typ A- E, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. subterminale*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* und *C. difficile* in die real-time PCR eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach dem in Tabelle 15 aufgeführten Temperatur-Zeit-Profil im Thermocycler Stratagene Mx3000P™.

Tabelle 15: Temperatur-Zeit-Profil *C. botulinum* Neurotoxin-Gen PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Amplifikation			45
Denaturierung	95°C	15 sec	
Annealing	60°C	60 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Kühlen	10°C	∞	

3.2.5.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht ein Auftrennen der amplifizierten Nukleinsäuresequenzen anhand ihrer Länge, wobei Amplifikate unterschiedlicher Länge auch unterschiedlich weit im elektrischen Feld wandern. Hierzu wird ein Agarosegel benötigt, sowie ein Farbstoff, der dazu dient die amplifizierte DNA durch Fluoreszenz als sogenannte Banden sichtbar zu machen. Die Amplifikate werden in Taschen am oberen Ende des Gels pipettiert und das Gel in eine Elektrophoresekammer eingelegt, die über eine Anode und eine Katode verfügt. Wird nun der Stromkreis geschlossen, wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur positiven Anode. Das Netzwerk des Agarosegels sorgt dafür, dass kleine Amplifikate schneller durch das Gel wandern als große. Somit kommt es zu einer Auftrennung nach der Anzahl der Basenpaare, die ein DNA-Fragment hat. Dem Agarosegel oder direkt der amplifizierten DNA muss ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt werden (hier HDGreen™ Plus), der sich an die DNA anlagert. Eine Sichtbarmachung erfolgt im Anschluss durch UV-Licht, in dem die Banden fluoreszieren. Eine qualitative Größenordnung erfolgt mittels eines parallel im Gel aufgetragenen Molekulargewichts-Standards, einer sogenannten „Ladder“, die bei der Gelelektrophorese mitgeführt wird. Jeder Probe wird vor dem Einfüllen in die Gel-Tasche ein Ladepuffer zugesetzt, der der Stabilisierung der DNA dient, das Absinken in der Gel-Tasche erleichtert und dem Sichtbarmachen der Lauffront dient.

Für die Herstellung der Agarosegele wurde die Agarose durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät in 1 x TAE-Puffer verflüssigt und auf 50°C abgekühlt. Die Rezepte sind den Tabellen 16 und 17 zu entnehmen. Eine Gelkammer wurde mit einem Kunststoffkamm versehen und das Gel blasenfrei hinein gegossen. Der Kunststoffkamm diente dazu, Gel-Taschen zu erzeugen, in die die Proben pipettiert wurden. Nachdem das Gel auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden die Proben zusammen mit 1/5 Volumen 6x Loading Dye (Thermo Scientific) in die Gel-Taschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels PowerPac™ 200 der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH bei 100 Volt für 100 Minuten. Als Molekulargewichts-Standard dienten der GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific) mit den Fragmentlängen in Basenpaaren (bp): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 und die DNA Ladder 50 bp (AppliChem GmbH) mit den Fragmentlängen 700; 500; 400; 350; 300 (x 2); 250; 200; 150; 100; 50 bp.

Tabelle 16: Agarosegel für die *C. perfringens* Toxin-Gen PCR

Zutat	Menge
Agarose Basis	3,0 g
1 x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	100,0 ml
HDGreen™ Plus	5,0 µl

Tabelle 17: Agarosegel für die *C. botulinum* NTNH-Gen PCR

Zutat	Menge
Agarose Basis	2,5 g
TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	100,0 ml
HDGreen™ Plus	5,0 µl

3.2.6 Molekularbiologische Untersuchung der Gärreste und Gärsubstrate

3.2.6.1 Aufbereitung der Proben

Zur Untersuchung der Feldproben wurden die bei -80°C eingefrorenen Rückstellproben und Anreicherungen in TPYG verwendet. Diese wurden mittels QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Bei den Rückstellproben wurde das „Protokoll zur Aufreinigung von DNA aus großen Mengen Kot“ des Herstellers verwendet (s. Anhang 9.1.2.1). Bei den Anreicherungen kam das Protokoll für die „Aufreinigung von DNA aus Stuhlproben zum Nachweis von Pathogenen“ zur Anwendung (s. Anhang 9.1.2.2). Dieses war bedingt durch die Konsistenz bzw. den Feststoffanteil, der bei den Rückstellproben deutlich höher lag als bei den Anreicherungen. Bei allen Aufreinigungen wurde eine

Aufreinigungskontrolle mitgeführt, bei der anstelle von Probenmaterial PBS verwendet wurde. Die aufgereinigte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.6.2 Nachweis von *Clostridium perfringens* Toxin-Genen

Der Nachweis von *C. perfringens* Toxin-Genen aus Feldproben erfolgte nach dem unter 3.2.5.2 beschriebenen Protokoll von VAN ASTEN et al. (2009). Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der anstelle von DNA PCR-Wasser verwendet wurde. Des Weiteren wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Referenzstämme als Positivkontrollen bei jeder PCR mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese für 100 Minuten bei 100 V in einem Gel mit 3 % Agarose, als Farbstoff wurde HDGreen™ Plus verwendet (5 µl HDGreen™ Plus / 100 ml Gel).

3.2.6.3 Nachweis von toxinbildenden *Clostridium botulinum*

Der Nachweis von toxinbildenden *C. botulinum* aus Feldproben und TPYG-Anreicherung erfolgte nach dem unter 3.2.5.3 beschriebenen Protokoll von HILL et al. (2010). Als Positivkontrollen wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Referenzstämme verwendet. Bei jeder PCR wurde zudem eine Negativkontrolle mitgeführt; hier wurde anstelle von DNA PCR-Wasser verwendet. Die Auswertung der konventionellen NTNH-Gen PCR erfolgte mittels Gelelektrophorese für 100 Minuten bei 100 V in einem Gel mit 2,5 % Agarose, der Farbstoff war HDGreen™ Plus (5 µl HDGreen™ Plus / 100 ml Gel).

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl von Nährmedien für die bakteriologische Untersuchung von Gärresten

4.1.1 Qualitätskontrolle der ausgewählten Fertignährböden

Die Koloniemorphologie der Bakterienstämme, die vom Hersteller als Qualitätskontrolle für die verwendeten Selektivmedien angegeben wurde, entsprach den Angaben des Herstellers mit Ausnahme von *C. perfringens* (ATCC 13124). Letzteres zeigte auf Membran Clostridium Perfringens Selektivnährboden nach der Bedampfung mit Ammoniak nicht die nach Herstellerangaben vorgegebene Verfärbung nach rosarot, sondern verfärbte sich Purpur, was gemäß Herstellerangaben die typische Verfärbung für andere Clostridienarten als *C. perfringens* ist. Aus diesem Grund wurde für das Beimpfen der Matrix ein in der Stammsammlung des Institutes vorhandenes Feldisolat von *C. perfringens* verwendet, das dem vom Hersteller vorgegeben Wachstum entsprach. *C. perfringens* (ATCC 13124) wurde von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Auch die in dieser Arbeit verwendeten

Feldisolate *E. coli* 0010-73-1 (CTX-M 1) und *E. coli* 003-13-2 (CTX-M 15 TEM) entsprachen in ihrem Wachstum auf den getesteten Selektivnährböden den Angaben des Herstellers.

4.1.2 Quantitativer Nachweis von Bakterien aus beimpfter Matrix

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 18 am Ende des Kapitels zusammengefasst. Die grafische Darstellung der mittels Probit-Analyse festgelegten Nachweisgrenzen findet sich im Anhang unter 9.2, Abbildungen 38 - 52.

4.1.2.1 Herstellung einer Testkeimsuspension

Von den unter Punkt 3.2.2 aufgeführten Bakterien wurde eine Testkeimsuspension hergestellt und deren Keimgehalt bestimmt. Mit diesem Versuchsansatz konnten die folgenden durchschnittlichen Keimgehalte erzielt werden:

• <i>E. coli</i> (DSM 1103)	7,3 x 10 ⁸ KbE/ml
• <i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	1,2 x 10 ⁹ KbE/ml
• <i>S. Enteritidis</i> (DSM 14221)	7,6 x 10 ⁸ KbE/ml
• <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	3,6 x 10 ⁸ KbE/ml
• <i>K. pneumoniae</i> SHV-18 (ATCC 700603)	1,8 x 10 ⁸ KbE/ml
• <i>E. coli</i> 0010-73-1 (CTX-M 1)	3,4 x 10 ⁸ KbE/ml
• <i>E. coli</i> 003-13-2 (CTX-M 15 TEM)	3,8 x 10 ⁸ KbE/ml
• <i>C. perfringens</i> (Feldisolat)	2,0 x 10 ⁶ KbE/ml
• <i>C. botulinum</i> Typ B BC 36/06 (REB 1931)	1,5 x 10 ² KbE/ml

Mit Ausnahme von *C. perfringens* und *C. botulinum* lagen die Ergebnisse im Bereich der Angabe, die gemäß CEN BT/TF 151 – WP3 Part I, Annex H. (ANON. 2007b) in der Testkeimsuspension vorhanden sein sollte (i.e. 10⁷-10⁹ KbE/ml).

Es zeigte sich, dass dieses Vorgehen für die Herstellung der Testkeimsuspension mit *C. botulinum* nicht praktikabel ist, da mit diesem Verfahren nur Keimmengen von 10² KbE/ml erreicht wurden. Aus diesem Grund wurde auf das Beimpfen von Matrix und Austesten der für *C. botulinum* ausgewählten Nährmedien verzichtet. Für alle anderen Testkeime wurde die Herstellung der Testkeimsuspensionen zum Beimpfen der Matrix nach diesem Verfahren gewählt.

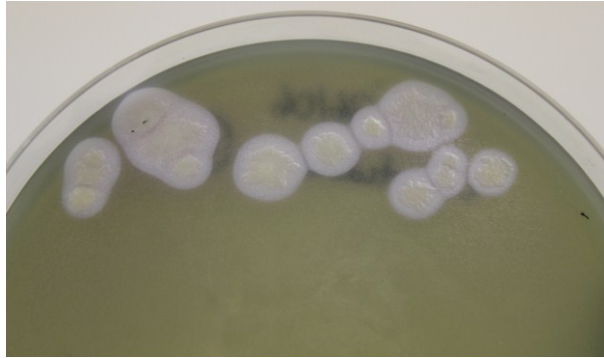


Abbildung 3: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931) auf Eigelb Laktose Agar

4.1.2.2 Vergleich von Brilliance™ Salmonella Agar, XLD Agar und XLT4 Agar

Für den Nachweis von *S. Typhimurium* aus beimpfter Matrix waren *Brilliance*™ Salmonella Agar, XLD- und XLT4 Agar in gleicher Weise gut geeignet. Die Nachweisgrenze lag bei 8 KbE/ml bzw. 9 KbE/ml (XLT4). Aufgrund der milchigen Farbe des *Brilliance*™ Salmonella Agar (Abbildung 4) war die Auszählung der Kolonien nur über den Petrischalendeckel und nicht von der Plattenunterseite her möglich, weshalb bei diesem Vorgehen darauf zu achten war, dass kein Kondenswasser auf den Agar tropft. Dieses hätte eine weitere Auswertung nach 48 h erschwert. Im Vergleich zur Untersuchung mit *S. Typhimurium* zeigten XLD (Abbildung 5) sowie XLT4 Agar (Abbildung 6) bei der Verwendung von *S. Enteritidis* aus beimpfter Matrix eine niedrigere Sensitivität. Die Nachweisgrenze lag hier bei 18 KbE/ml (XLD) bzw. 90 KbE/ml (XLT4) (Tabelle 18). *Brilliance*™ Salmonella Agar ergab für beide *Salmonella* Serovare nahezu identische Ergebnisse und wurde deshalb zur Untersuchung der Feldproben ausgewählt. Darüber hinaus wurde der XLT4 Agar in Anlehnung an die EN ISO 6579:2002+A1:2007-10 (ANON. 2007c) als zweites Selektivmedium ausgewählt.

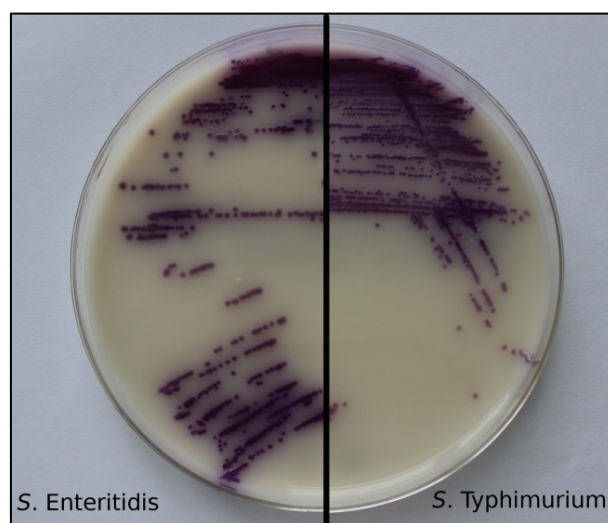


Abbildung 4: *Salmonella* auf *Brilliance*™ Salmonella Agar

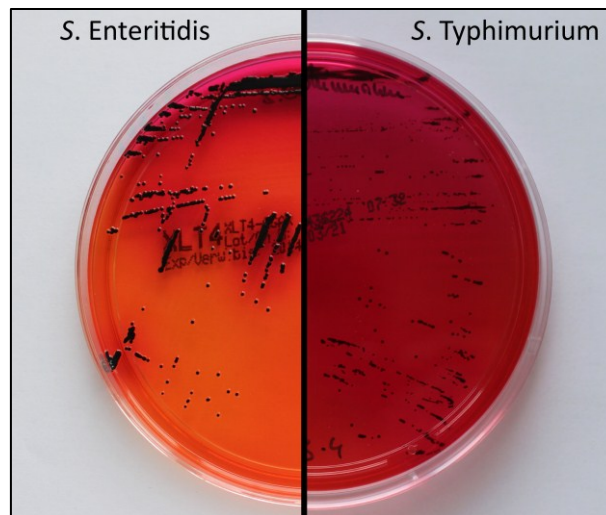


Abbildung 5: *Salmonella* auf XLT4 Agar

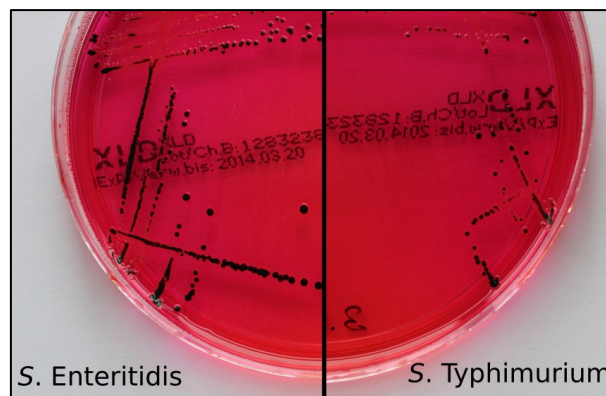


Abbildung 6: *Salmonella* auf XLD Agar

4.1.2.3 Vergleich Slanetz Bartley Agar und Enterococcus Selektivagar

Auf Slanetz-Bartley Agar waren die Kolonien von *Enterococcus faecalis* nach 24 h sehr fein (stecknadelspitzen groß), erreichten jedoch nach 48 h eine Größe von 1 mm (Abbildung 6 rechts). Die Koloniefarbe variierte von rötlich-braun bis rot. Im Gegensatz dazu hatten die Kolonien auf Enterococcus Selektivagar bereits nach 24 h einen Durchmesser von >1 mm und zeigten einen charakteristischen braun-schwarzen bis schwarzen Hof um die Kolonie, der dem Nachweis der Äskulinspaltung dient (Abbildung 7 links). Trotz der Schwarzfärbung des Agars, die typischerweise das Wachstum von fäkalen Streptokokken der Lancefield Gruppe D (Enterokokken) anzeigt, war die Auswertung gut durchführbar. Für beide Nährmedien lag die untere Nachweisgrenze bei 11 KbE/ml (Tabelle 18). Aufgrund der besseren Auswertung, d. h. der größeren Kolonieform nach 24 h, wurde für die Untersuchung von Gärresten der Enterococcus Selektivagar ausgewählt.

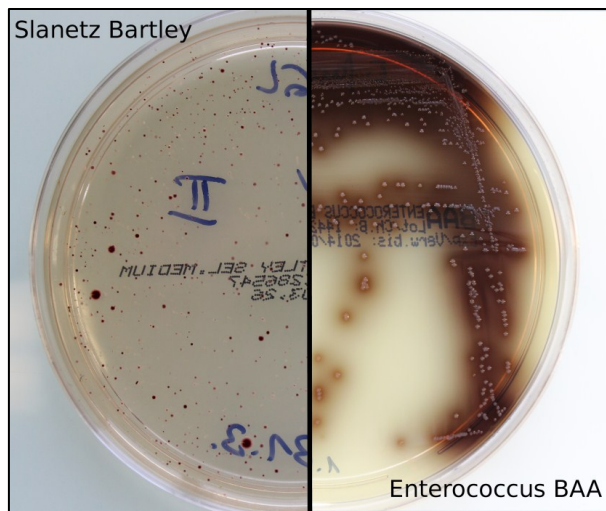


Abbildung 7: *Enterococcus faecalis* auf Slanetz Bartley Agar und Enterococcus Selektivagar

4.1.2.4 Vergleich von Tergitol 7 Lactose TTC Agar und *Brilliance*™ *E. coli*/Coliform Selektiv Agar

Sowohl TTC Agar als auch *Brilliance*™ *E. coli*/Coliform Selektiv Agar (Abbildung 8) erwiesen sich als geeignet zum Nachweis von *E. coli* aus beimpfter Matrix. Bei der Verwendung von TTC Agar lag die untere Nachweisgrenze bei 38 KbE/ml, während *Brilliance*™ *E. coli*/Coliform Selektiv Agar 5 KbE/ml sicher detektierte (Tabelle 18). Aufgrund der höheren Sensitivität und der Differenzierungsmöglichkeit zwischen *E. coli* und coliformen Keimen wurde der chromogene *Brilliance*™ *E. coli*/Coliform Selektiv Agar zur Untersuchung der Feldproben ausgewählt.

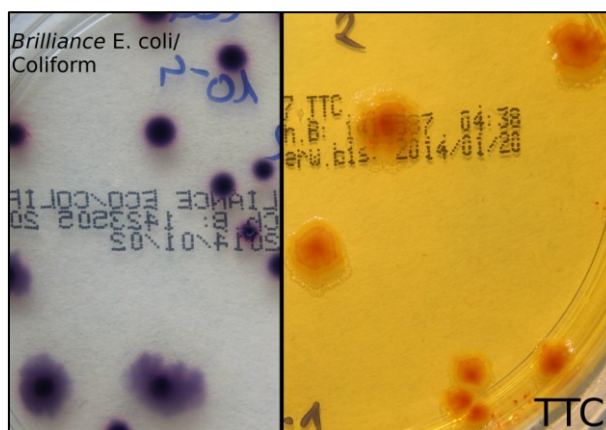


Abbildung 8: *Escherichia coli* auf *Brilliance*™ *E. coli*/Coliform Selektiv Agar (links) und Tergitol 7 Lactose TTC Agar (rechts)

4.1.2.5 *Brilliance*™ ESBL Agar

Der *Brilliance*™ ESBL Agar basiert ebenfalls auf chromogenen Substraten und kann gemäß Hersteller direkt mit Stuhlproben beimpft werden. Durch die chromogenen Substanzen kann

zwischen den am meisten verbreiteten ESBL-bildenden Organismen unterschieden werden. Gemäß Hersteller wächst *E. coli* blau/türkis oder pink/rosa (Galactosidase-negativ). Die beiden verwendeten ESBL-bildenden *E. coli* waren auf diesem Agar in verschiedenen Blautönen gefärbt. *E. coli* 003-13-2 (CTX-M 15 TEM) zeigte sich auf dem *Brilliance*™ ESBL Agar in einem dunkleren Blau (Abbildung 9 rechts). Deutliche Unterschiede zeigten sich auch in der Nachweisgrenze, die für *E. coli* 0010-73-1 (CTX-M 1) 5 KbE/ml betrug und für *E. coli* 003-13-2 (CTX-M 15 TEM) bei 23 KbE/ml lag (Tabelle 18).

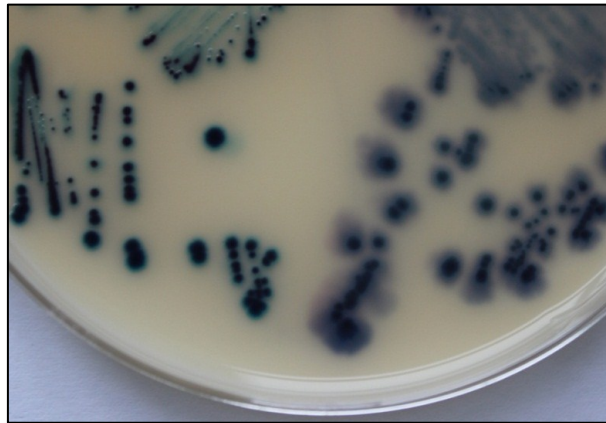


Abbildung 9: *E. coli* 0010-73-1 (links) und *E. coli* 003-13-2 (rechts) auf Brilliance™ ESBL Agar

Phänotypisch ist *K. pneumoniae* SHV-18 (ATCC 700603) auf dem *Brilliance*™ ESBL Agar in hellem Türkisblau gewachsen (Abbildung 10). Die Kolonien waren nach 24 h Inkubation bei 37°C sehr fein gewachsen. Ein definitives Auszählen war erst nach einer Inkubationszeit von 48 h möglich, da sich die Anzahl der Kolonien nach 48 h im Vergleich zu der Anzahl nach 24 h erheblich änderte. 11 KbE/ml waren mit dem *Brilliance*™ ESBL Agar sicher nachweisbar (Tabelle 18).



Abbildung 10: *K. pneumoniae* SHV-18 auf Brilliance™ ESBL Agar

4.1.2.6 Vergleich von Membran Clostridium Perfringens Selektivnährboden und TSC Agar

Sowohl mCP als auch TSC Agar erwiesen sich als geeignet, um *C. perfringens* aus beimpfter Matrix nachzuweisen. Beide Nährböden benötigten für die eindeutige Auswertung eine zusätzliche Behandlung. Bei der Verwendung von mCP Agar mussten die verdächtigen, opak-gelb wachsenden Kolonien auf der Platte mit Ammoniak bedampft werden. Ein Farbumschlag nach rosarot zeigte den Nachweis von *C. perfringens* an. Der TSC Agar wurde unmittelbar nach dem Beimpfen überschichtet, damit die Kolonien eine deutliche Schwarzfärbung ausbildeten. Durch Aktivität des *C. perfringens*-Enzyms Lecithinase entstanden opak-weiße Zonen um die Kolonie, die in Abbildung 11 deutlich zu erkennen sind. Durch die notwendige Überschichtung war dieses Kultur-Verfahren im Vergleich zur Verwendung des mCP Agars aufwendiger. Verdächtige schwarze Kolonien ohne eindeutig opake Zone mussten darüber hinaus subkultiviert und biochemisch bestätigt werden. Trotz der geringeren Sensitivität (11 KbE/ml) fiel die Entscheidung zu Gunsten des TSC Agars aus, da hier kein Hantieren mit der offenen Platte über einer Ammoniakflasche nötig war. Außerdem zeigte sich in den Vorversuchen mit mCP Agar, dass der Farbumschlag nach rosarot nicht immer eindeutig ist. So zeigte *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), das als Positivkontrolle für den mCP Agar angegeben ist, einen Farbumschlag nach purpur.

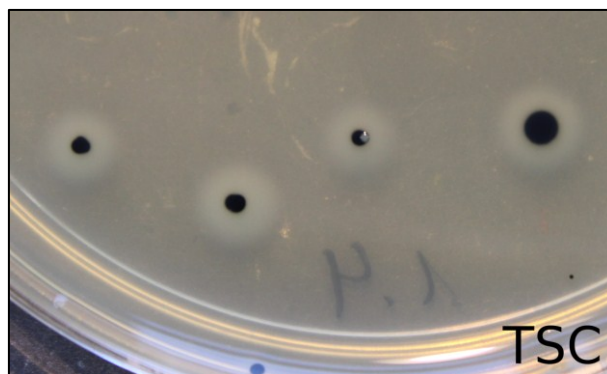


Abbildung 11: *C. perfringens* (Feldisolat) auf TSC Agar

Tabelle 18: Nachweis von Bakterien aus beimpfter Matrix – Bestimmung der Nachweisgrenze für verschiedene Nährböden

Indikatorkeim	Nachweisgrenze (p=0.95) in KbE/ml									
	XLD	XLT4	B SALM	Slanetz Bartley	EBAA	B E. coli	TTC	B ESBL	TSC	mCP
<i>S. Typhimurium</i>	8	9	8	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
<i>S. Enteritidis</i>	18	90	9	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
<i>E. faecalis</i>	nt	nt	nt	11	11	nt	nt	nt	nt	nt
<i>E. coli</i>	nt	nt	nt	nt	nt	5	38	nt	nt	nt
<i>K. pneumoniae</i> SHV-18	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	11	nt	nt
<i>E. coli</i> 0010-73-1	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	5	nt	nt
<i>E. coli</i> 003-13-2	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	23	nt	nt
<i>C. perfringens</i>	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	11	2

nt = nicht getestet, B SALM = *Brilliance*™ Salmonella Agar, EBAA = Enterococcus Selektivagar, B E. coli = *Brilliance*™ E. coli/Coliform Selektiv Agar, TTC = Tergitol 7 Lactose TTC Agar, B ESBL = *Brilliance*™ ESBL Agar

4.2 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von *C. perfringens* und *C. botulinum*

4.2.1 Aufbereitung der Proben

4.2.1.1 Aufreinigung von DNA aus grampositiven Bakterien

Das QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) wurde verwendet, um DNA aus allen in der bakteriologischen Untersuchung der Gärreste und Gärsubstrate gewonnenen Feldisolaten zu extrahieren. Es wurden 10 bis 50 µg DNA mit einer Konzentration zwischen 100 und 150 ng/µl gewonnen.

4.2.1.2 Aufreinigung von DNA aus Rückstellproben (nativer Gärrest, Gärsubstrate)

Hierfür wurde das QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) nach der Arbeitsanweisung des Herstellers zur „Aufreinigung von DNA aus großen Mengen Kot“ verwendet. Dieses Kit wurde ausgewählt, da es besonders geeignet ist, PCR-inhibierende Substanzen aus den Proben zu entfernen. Die Qualität der gewonnen DNA war gut und ihre Konzentration lag ungefähr bei 100 ng/µl.

4.2.1.3 Aufreinigung von DNA aus Anreicherungen in TPYG-Bouillon

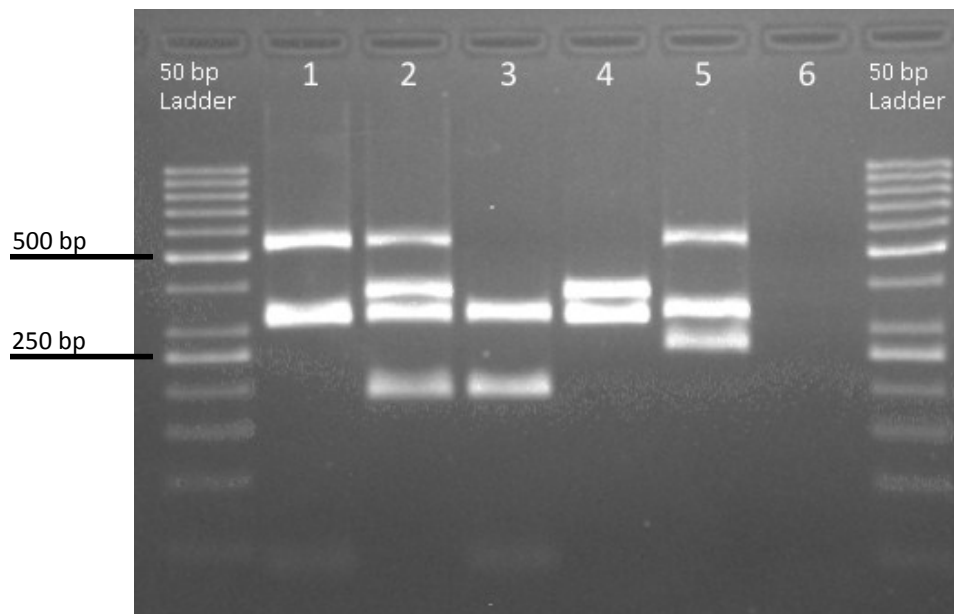
Um DNA zum Nachweis von *C. perfringens* und *C. botulinum* aus allen in TPYG angereicherten Proben aufzureinigen, wurde ebenfalls das QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit verwendet. Das Protokoll des Herstellers zur „Aufreinigung von DNA aus Stuhlproben zum Nachweis von Pathogenen“ kam hier zur Anwendung. Die Konzentration der gewonnenen DNA lag zwischen 100 – 150 ng/µl.

4.2.2 Clostridium perfringens Toxin-Gen PCR

Das PCR Protokoll zur Toxin-Gen Bestimmung von *C. perfringens* nach VAN ASTEN et al. (2009) zeigte sich als geeignet für die Typisierung von *C. perfringens* aus aufgereinigter Bakterien-DNA zu führen. In Abbildung 12 ist das Ergebnis der Positivkontrollen im Agarosegel dargestellt. In Tabelle 19 sind die erwarteten Ergebnisse für die Positivkontrollen mit ihren Toxin-Genen aufgeführt. Die sogenannten Major-Toxine sind in Fettdruck dargestellt. Mit Ausnahme von *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324) ergaben alle Referenzstämme das erwartete Bandenmuster. Bei Typ E fehlt die Bande für das Enterotoxin-Gen (485 bp) (Abbildung 12). Die DNA von *C. sordellii*, *C. subterminale*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* und *C. difficile* ergab keine Amplifikate (Abbildung 33, Bahn 19-25).

Tabelle 19: Erwartete Amplifikatgrößen der Positivkontrollen für die *C. perfringens* PCR

Referenzstamm	Toxin-Gen	Toxin	Amplifikatgröße
<i>C. perfringens</i> Typ A (DSM 756)	<i>cpa</i>	α -Toxin	324 bp
	<i>cpb2</i>	β_2 -Toxin	548 bp
<i>C. perfringens</i> Typ B (ATCC 3626)	<i>cpa</i>	α -Toxin	324 bp
	<i>cpb</i>	β -Toxin	195 bp
	<i>etx</i>	ϵ -Toxin	376 bp
	<i>cpb2</i>	β_2 -Toxin	548 bp
<i>C. perfringens</i> Typ C (NCTC 3180)	<i>cpa</i>	α -Toxin	324 bp
	<i>cpb</i>	β -Toxin	195 bp
<i>C. perfringens</i> Typ D (NCTC 8504)	<i>cpa</i>	α -Toxin	324 bp
	<i>etx</i>	ϵ -Toxin	376 bp
<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	<i>cpa</i>	α -Toxin	324 bp
	<i>iap</i>	ι -Toxin	272 bp
	<i>cpe</i>	Enterotoxin	485 bp
	<i>cpb2</i>	β_2 -Toxin	548 bp

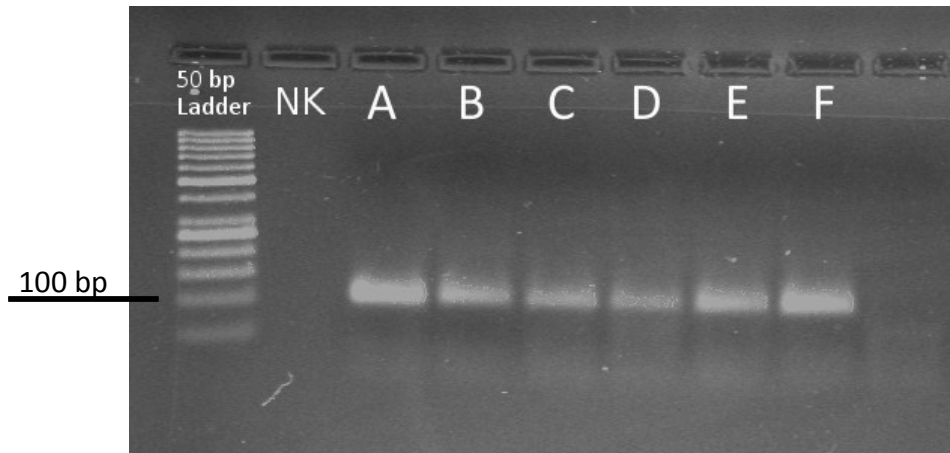


**Abbildung 12: Ergebnis der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR mit den Positivkontrollen;
Auswertung im Agarosegel (3%)**

1: *C. perfringens* Typ A (DSM 756); 2: *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); 3: *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); 4: *C. perfringens* Typ D (NCTC 8504); 5: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 6: Negativkontrolle

4.2.3 *Clostridium botulinum* Toxin-Gen PCR

Die PCR von HILL et al. (2010) detektierte bei allen vorhandenen Positivkontrollen das NTNH-Gen sowie die Neurotoxin-Gene *bont* A bis F (Abbildung 13, Tabelle 20 und 21). Bei allen Positivkontrollen ergab die Auswertung der NTNH-Gen PCR im Agarosegel eine Bande von ca. 101 bp, welche der erwarteten Amplifikatgröße entsprach (Abbildung 13). Auf der Höhe von etwa 50 bp sind im Agarosegel Primer-Dimere zu erkennen (Abbildungen 13 und 14).



**Abbildung 13: Ergebnis der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR mit den Positivkontrollen;
Auswertung im Agarosegel (2,5%)**

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); B: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931); C: *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455); D: *C. botulinum* Typ D (B-1720-01); E: *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718); F: *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281); NK: Negativkontrolle

Mit der DNA von *C. perfringens* Typ A, B, C und E wurden unspezifische Amplifikationsprodukte erzielt, die jedoch eindeutig von dem erwarteten spezifischen Amplifikat von 101 bp unterschieden werden konnten (Abbildung 14 Bahn 1-3 und 6). Diese unspezifischen Produkte zeigten sich als Banden von ungefähr 350 bp und 500 bp. *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. subterminale*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* und *C. difficile* ergaben in der NTNH-PCR keine Amplifikate (Abbildung 14, Tabelle 20).

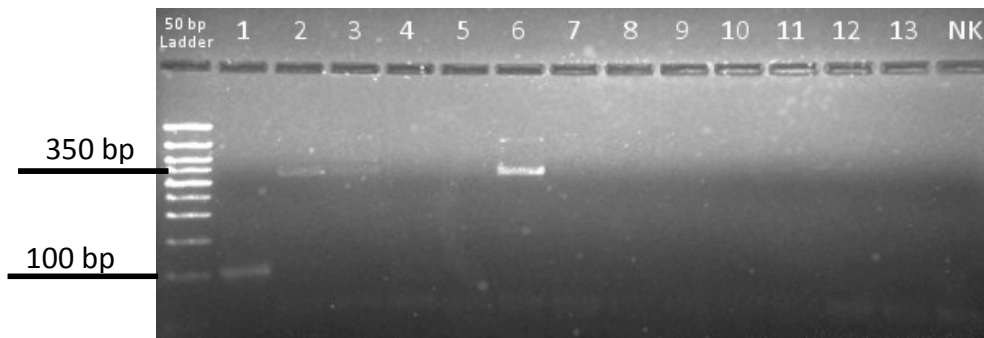


Abbildung 14: Ergebnis der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR mit verschiedenen Clostridienstämmen; Auswertung im Agarosegel (2,5%)

1: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); 2: *C. perfringens* Typ A (DSM 756); 3: *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); 4: *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); 5: *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); 6: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 7: *C. novyi* (REN 773); 8: *C. sordellii* (Feldisolat); 9: *C. bifermentas* (Feldisolat); 10: *C. subterminale* (Feldisolat); 11: *C. sporogenes* (Feldisolat); 12: *C. butyricum* (Feldisolat); 13: *C. difficile* (Feldisolat); NK: Negativkontrolle

Tabelle 20: Ergebnisse der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR

Referenzstamm	Amplifikatgröße (ca.)
<i>C. botulinum</i> Typ A S0174/09 (REB 1472)	101 bp
<i>C. botulinum</i> Typ B BC 36/06 (REB 1931)	101 bp
<i>C. botulinum</i> Typ C S0028/10 (REB 1455)	101 bp
<i>C. botulinum</i> Typ D B-1720-01	101 bp
<i>C. botulinum</i> Typ E S0187/09 (REB 1718)	101 bp
<i>C. botulinum</i> Typ F BC 69/06 (NCTC 10281)	101 bp
<i>C. perfringens</i> Typ A (DSM 756)	350 bp
<i>C. perfringens</i> Typ B (ATCC 3626)	350 bp
<i>C. perfringens</i> Typ C (NCTC 3180)	350 bp (schwach)
<i>C. perfringens</i> Typ D (ATCC 12917)	kein Amplifikat
<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	350 bp; 500 bp
<i>C. novyi</i> (REN 773)	kein Amplifikat
<i>C. sordellii</i> (Feldisolat)	kein Amplifikat
<i>C. bifermentas</i> (Feldisolat)	kein Amplifikat
<i>C. subterminale</i> (Feldisolat)	kein Amplifikat
<i>C. sporogenes</i> (Feldisolat)	kein Amplifikat
<i>C. butyricum</i> (Feldisolat)	kein Amplifikat
<i>C. difficile</i> (Feldisolat)	kein Amplifikat

In der real-time PCR zum Nachweis der Neurotoxin-Gene der verschiedenen Toxintypen (A bis F) ergaben alle Referenzstämme ein spezifisches Signal (Abbildung 15). *C. botulinum* Typ A zeigte ein Amplifikationssignal für *bont A* und *bont B* (Tabelle 21, Anhang 9.2 Abbildung 53). Jeder Mastermix erbrachte ein Signal für das spezifische Ziel-Gen. Eine Kreuzreaktion konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 15, Tabelle 21, Anhang 9.2 Abbildungen 53-57). *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. subterminale*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* und *C. difficile* zeigten mit keinem Mastermix zur Detektion von *bont A* bis *bont F* ein Amplifikationssignal (Anhang 9.2 Abbildungen 58 bis 60)

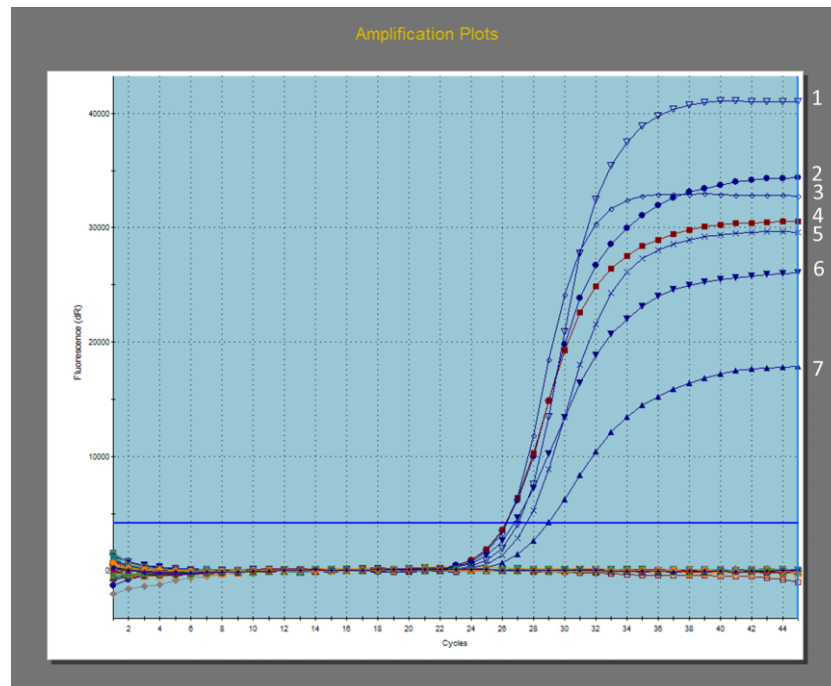


Abbildung 15: Auswertung der real-time PCR zur Neurotoxin-Typ Bestimmung von *C. botulinum*

1: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ E mit *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718) DNA; 2: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ A mit *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472) DNA; 3: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ C mit *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455) DNA; 4: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ B mit *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472) DNA; 5: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ B mit *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931) DNA; 6: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ F mit *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281) DNA; 7 : Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ D mit *C. botulinum* Typ D (B-1720-01) DNA

In der nachfolgenden Abbildung 16 ist beispielhaft die Auswertung der real-time PCR für den Mastermix zur Detektion von *bont A* dargestellt. Die *C. botulinum* Typ A-DNA und der Mastermix für *bont A* ergaben ein Amplifikationsprodukt (Bahn A) in der erwarteten Größe von 227 bp. Die DNA der anderen *C. botulinum* BoNT-Typen ergaben kein Amplifikationsprodukt (Bahn B-F). Im Agarosegel sind darüber hinaus auf der Höhe der 50 bp-Bande der Ladder Primer-Dimere zu erkennen.

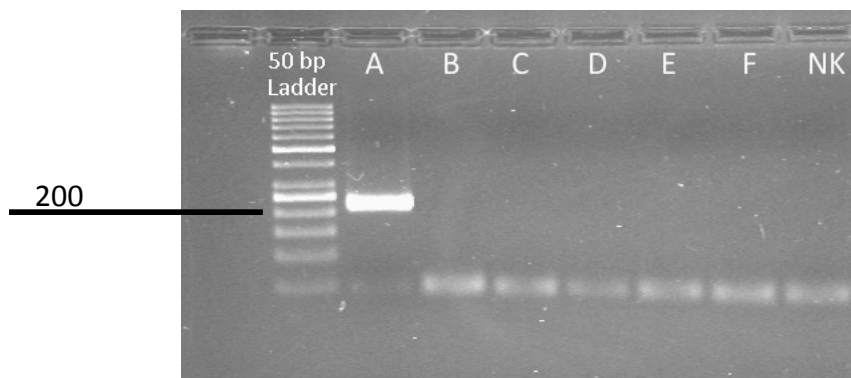


Abbildung 16: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont A* im Agarosegel (2,5%)

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); B: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931); C: *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455); D: *C. botulinum* Typ D (B-1720-01); E: *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718); F: *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281); NK: Negativkontrolle

Tabelle 21: Ergebnisübersicht der *C. botulinum bont*-real-time PCR

Stamm	Amplifikationssignal mit dem Mastermix für						Amplifikatgröße
	<i>bont A</i>	<i>bont B</i>	<i>bont C</i>	<i>bont D</i>	<i>bont E</i>	<i>bont F</i>	
<i>C. botulinum</i> Typ A	+	-	-	-	-	-	227 bp
<i>C. botulinum</i> Typ A	-	+	-	-	-	-	214 bp
<i>C. botulinum</i> Typ B	-	+	-	-	-	-	214 bp
<i>C. botulinum</i> Typ C	-	-	+	-	-	-	181 bp
<i>C. botulinum</i> Typ D	-	-	-	+	-	-	250 bp
<i>C. botulinum</i> Typ E	-	-	-	-	+	-	230 bp
<i>C. botulinum</i> Typ F	-	-	-	-	-	+	158 bp

4.3 Bakteriologische Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten aus Biogasanlagen

4.3.1 Einfluss der Matrix auf die Auswertung der Agarplatten

Aufgrund der Ergebnisse, die mittels beimpfter Matrix erzielt wurden, kamen zunächst folgende Nährmedien zur bakteriologischen Untersuchung der Feldproben zum Einsatz: *Brilliance™* Salmonella Agar, *Brilliance™* E. coli/Coliform Selektiv Agar, *Brilliance™* ESBL Agar, Enterococcus Selektivagar und TSC Agar überschichtet mit TSC Agar Basis. Darüber hinaus wurde XLT4 Agar als zweites festes Selektivmedium für den Salmonellennachweis eingesetzt. Für den Nachweis von *C. botulinum* der Eigelb-Laktose Agar eingesetzt.

Bei der Untersuchung von Proben aus den verschiedenen Biogasanlagen zeigte sich, dass die mikrobielle Begleitflora das Ergebnis bzw. die Auswertbarkeit von einigen Nährböden stark beeinflusste. Dieses führte u.a. zur notwendigen Bestätigung verdächtiger Bakterienkolonien bzw. zum Wechsel des Nährmediums (siehe unten).

Brilliance™ Salmonella Agar

Auf dem *Brilliance™* Salmonella Agar waren in einigen Proben nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C Salmonellen-verdächtige violett/pink aussehende Kolonien zu erkennen (Abbildung 17).

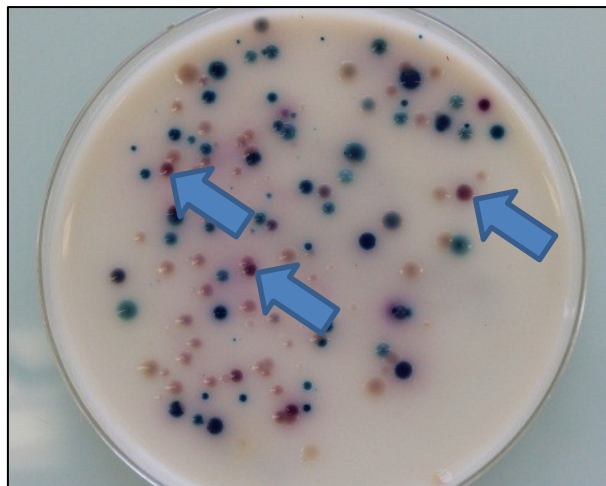


Abbildung 17: Gärrest auf *Brilliance™* Salmonella Agar

Alle phänotypisch verdächtigen Kolonien wurden auf Columbia Agar mit Schafblut^{PLUS} (5% Schafblut) und Gassner Medium subkultiviert. Aufgrund weiterführender Differenzierungen stellte sich in allen Fällen heraus, dass es sich um *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus* und *Providentia rettgeri* handelte. Darüber hinaus war vor allem bei niedrig verdünnten Proben nach 24 h Bebrütung eine unspezifische Verfärbung des Mediums zu beobachten.

Enterococcus Selektivagar

Entgegen den Ergebnissen zur Auswahl der Nährmedien erwies sich der Enterococcus Selektivagar bei der Untersuchung der ersten Feldproben als nicht auswertbar. Die in den Gärresten und Gärsubstraten enthaltene Begleitflora verursachte eine intensive Schwarzfärbung des gesamten Nährbodens (Abbildung 18). Hierdurch war nicht mehr eindeutig zu differenzieren, welche Kolonien einen braun-schwarzen Hof aufwiesen, der charakteristisch für fäkale Enterokokken ist. Aufgrund dessen wurde bei den weiteren Untersuchungen im Rahmen des Projektes der Nachweis auf Enterokokken mittels Slanetz Bartley Agar geführt. Bedingt durch das feine Erscheinungsbild der Kolonien auf diesem Nährboden nach 24 h Bebrütung wurde die Auswertung im weiteren Projektverlauf nach 48 h und 72 h durchgeführt.

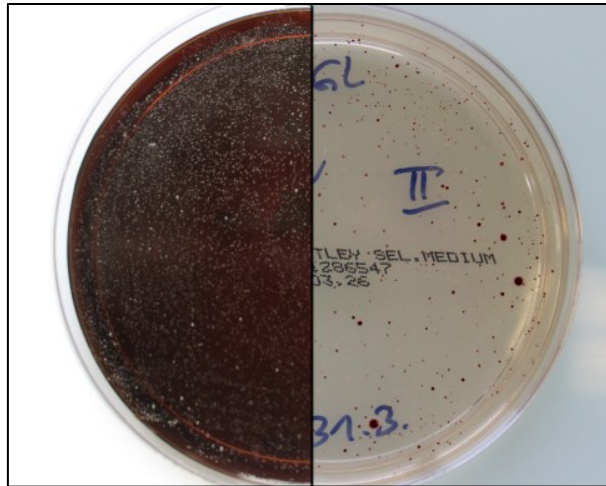


Abbildung 18: Native Feldprobe 1:10 verdünnt auf Enterococcus Selektivagar (links) und Slanetz Bartley Agar (rechts)

Brilliance™ E. coli/Coliform Selektiv Agar

Auf diesem Agar waren die Kolonien von *E. coli* (dunkel violett) und coliformen Keimen (rosarot) farblich gut zu differenzieren (Abbildung 19). Lediglich bei einigen Kolonien, die nach 24 h als coliforme Keime identifiziert wurden (Farbe rosarot), war nach 48 h eine Farbänderung in Richtung violett (*E. coli*) zu beobachten.

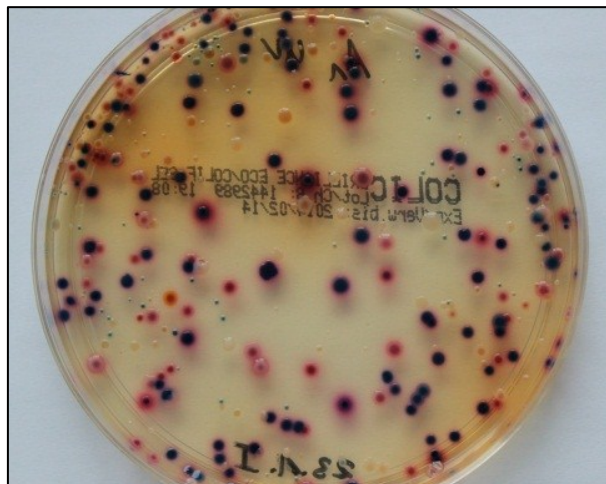


Abbildung 19: Feldprobe auf Brilliance™ E. coli/Coliform Selektiv Agar

Eigelb Laktose Agar und TSC Agar

Bei beiden anaerob bebrüteten Nährmedien zeigte sich, dass das Erhitzen der zu untersuchenden Probe für 15 min. bei 65°C zu einem vermehrten Nachweis von *C. perfringens* führte. Darüber hinaus war bei der Anwendung von Eigelb Laktose Agar, ebenso wie bei der Verwendung des Slanetz Bartley Agars, eine Auswertung nach 48 h und 72 h sinnvoll. Im Gegensatz dazu zeigte der TSC Agar nach 24 h gut auszählbare Kolonien. Nach 48

h war die Schwarzfärbung, ähnlich dem *Enterococcus* Selektivagar, so intensiv, dass eine Zuordnung der Schwarzfärbung zu einzelnen Kolonien nicht mehr möglich war.

4.3.2 Nachweis der Indikatororganismen in Gärresten und Gärsubstraten aus Biogasanlagen

Die qualitative und quantitative Untersuchung der Feldproben mittels der vorangehend beschriebenen Nährmedien erfolgte auf Enterokokken, Salmonellen, *E. coli*, coliforme Keime, ESBL-bildende *Enterobacteriaceae*, *C. perfringens* und *C. botulinum*. Darüber hinaus wurde die aerobe Lebendkeimzahl auf Standard-Nähragar I bestimmt. Alle Kolonien, die verdächtig für ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* waren, wurden zudem, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, mit der Micronaut-S β -Lactamase VII Testplatte (Merlin Diagnostika) untersucht. In den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen sind nur die phänotypisch bestätigten ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* aufgeführt. In keiner der untersuchten Proben konnten mit den hier verwendeten Nachweismethoden Salmonellen oder *C. botulinum* nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen der jeweils zur Verfügung stehenden Proben sind für die einzelnen Pilotbetriebe in den Abbildungen 20 – 31 aufgelistet.

4.3.2.1 Pilotbetrieb 2

Aus der Biogasanlage von Pilotbetrieb 2 wurden Proben aus beiden Fermentern sowie dem Nachgärer entnommen.

Die aerobe Lebendkeimzahl lag in allen beprobten Kompartimenten bei 10^5 KbE/g Probe. In Fermenter 1 lag der Gehalt von *C. perfringens* bei $2,00 \times 10^5$ KbE/g Probe, während in Fermenter 2 und im Nachgärer kein Nachweis gelang. Der Gehalt an Enterokokken reduzierte sich im Prozessverlauf um etwa 0,6 \log_{10} -Stufen von $4,65 \times 10^3$ KbE/g (Fermenter 1) auf $8,75 \times 10^2$ KbE/g Probe (Nachgärer). Mit den verwendeten Methoden war kein Nachweis von coliformen Keimen, *E. coli* und ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* möglich (Abbildung 20).

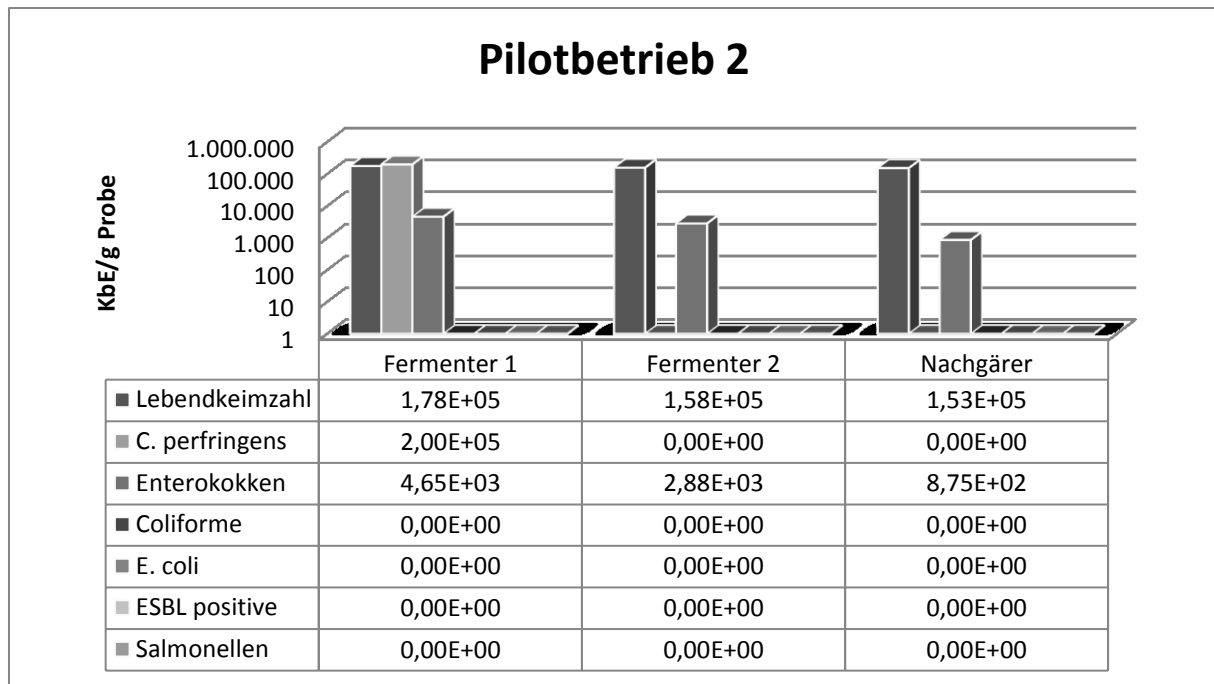


Abbildung 20: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 2

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.2 Pilotbetrieb 3

In Pilotbetrieb 3 wurden Proben aus dem Fermenter und dem thermophil gefahrenen Nachgärer (Temperatur > 50°C) untersucht.

Die aerobe Lebendkeimzahl reduzierte sich im Biogasprozess vom Fermenter hin zum thermophilen Nachgärer um 2 \log_{10} -Stufen von $1,08 \times 10^8$ KbE/g Probe auf $2,25 \times 10^6$ KbE/g Probe. Der Gehalt an Enterokokken in der Fermenterprobe ($3,80 \times 10^5$ KbE/g Probe) lag ebenfalls um 2 \log_{10} -Stufen höher als die Menge in der Probe aus dem Nachgärer ($2,80 \times 10^3$ KbE/g Probe). Im Fermenter waren coliforme Bakterien und *E. coli* mit $7,00 \times 10^3$ KbE/g Probe bzw. $1,23 \times 10^4$ KbE/g Probe nachweisbar während in der Probe aus dem Nachgärer kein Nachweis möglich war. Dieses entspricht einer Reduktion um drei bzw. vier Zehnerpotenzen. *C. perfringens* und ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* konnten in keiner der Proben mit den hier verwendeten Methoden nachgewiesen werden. (Abbildung 21)

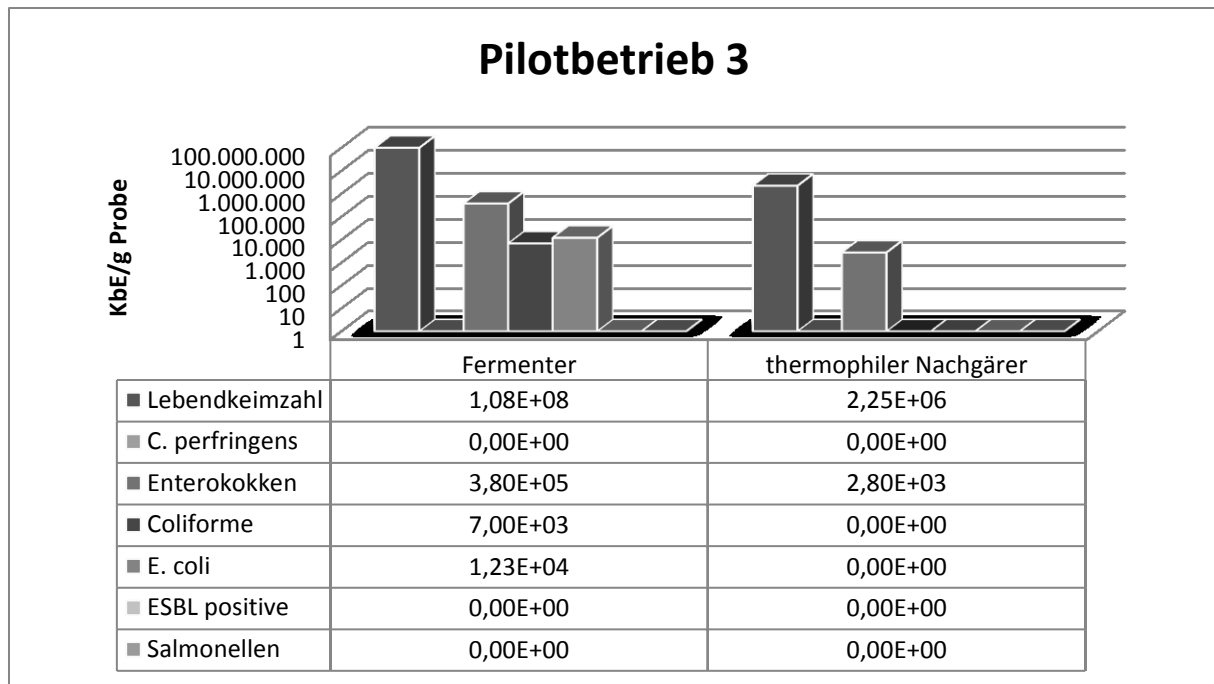


Abbildung 21: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 3

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.3 Pilotbetrieb 4

In Pilotbetrieb 4 konnten Proben aus allen Kompartimenten der Biogasanlage, d.h. Vorgrube, Fermenter, Nachgärer und Gärrestelager, entnommen werden.

Die Reduktion der aeroben Lebendkeimzahl betrug von der Vorgrube bis zum Gärrestelager 3 \log_{10} -Stufen (siehe Abbildung 22). Der Gehalt von *C. perfringens* in den verschiedenen Proben differierte geringgradig, er lag im Bereich von 10^4 KbE/g Probe. In der Vorgrubenprobe wurden $4,25 \times 10^4$ KbE/g Probe Enterokokken nachgewiesen, im Nachgärer $6,00 \times 10^2$ KbE/g Probe. In der Probe des Gärrestelagers lag der Gehalt mit $2,30 \times 10^3$ KbE/g Probe über dem Gehalt der Probe des Nachgärers. Bei den coliformen Bakterien sowie *E. coli* reduzierte sich die Menge von 10^6 KbE/g Probe aus der Vorgrube auf 10^2 KbE/g Probe des Gärrestelagers; somit ergibt sich eine Reduktion im Biogasprozess um 4 \log_{10} -Stufen. Aus der Vorgrubenprobe von Pilotbetrieb 4 wurden $2,85 \times 10^3$ KbE/g Probe ESBL-bildende *E. coli* angezüchtet; in den anderen Proben waren keine ESBL-bildenden Bakterien nachweisbar. Dieses entspricht einer Reduktion dieser Bakterien im Biogasprozess um drei Zehnerpotenzen.

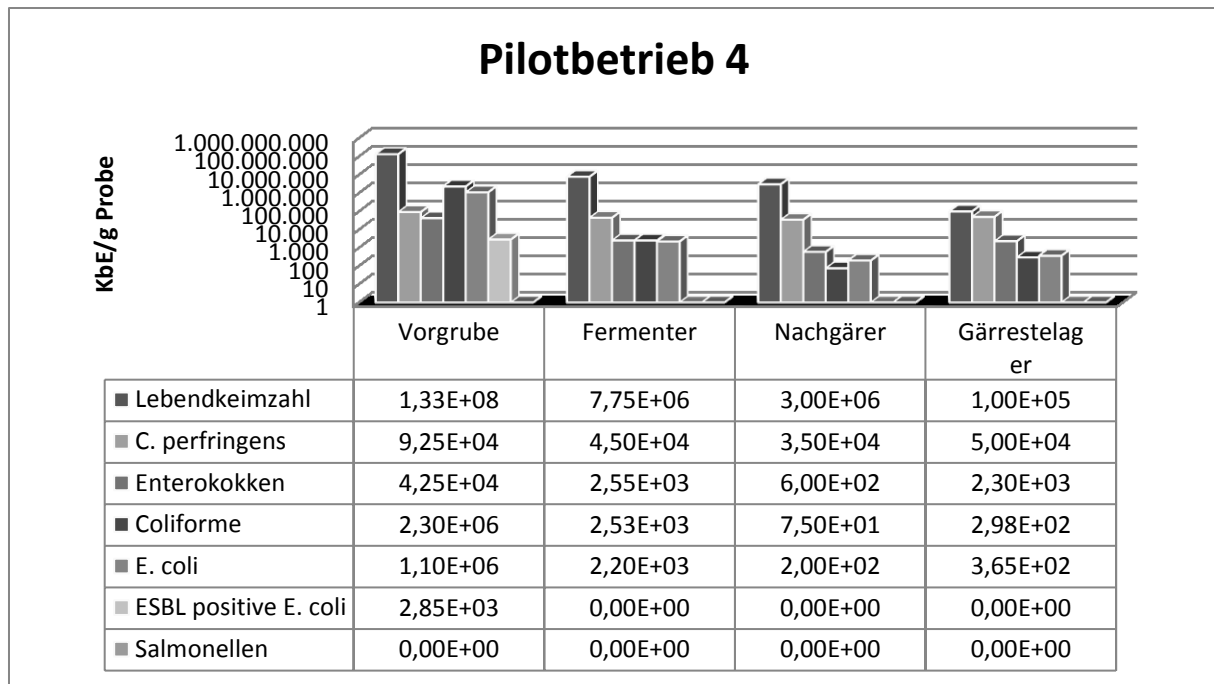


Abbildung 22: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 4

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.4 Pilotbetrieb 5

Von Pilotbetrieb 5 wurden Proben aus der Vorgrube, dem Fermenter und dem Nachgärer untersucht.

In der Probe aus der Vorgrube betrug die aerobe Lebendkeimzahl $2,93 \times 10^8$ KbE/g. Im Untersuchungsmaterial aus dem Nachgärer waren $8,75 \times 10^6$ KbE/g Probe nachweisbar. Der Gehalt an *C. perfringens* lag in allen Proben dieser Biogasanlage bei etwa 10^4 KbE/g Probe. Die Menge an Enterokokken wurde im Verlauf des Biogasprozesses von der Vorgrube zum Fermenter um zwei Zehnerpotenzen reduziert (siehe Abbildung 23). Im Vergleich zu der Probe aus dem Fermenter ($1,00 \times 10^2$ KbE/g Probe) lag der Gehalt an Enterokokken in der Probe des Nachgärers mit $1,18 \times 10^3$ KbE/g Probe um 1 \log_{10} -Stufe höher. Die Fermenterprobe enthielt $8,48 \times 10^4$ KbE/g coliforme Bakterien; im Nachgärer waren es $1,00 \times 10^2$ KbE/g Probe, was einer Reduktion um 2 \log_{10} -Stufen entspricht. Von *E. coli* gelang die Anzucht von $4,50 \times 10^4$ KbE/g (Vorgrube) bzw. $5,00 \times 10^1$ KbE/g (Nachgärer). Somit kam es im Biogasprozess zu einer Reduktion dieses Bakteriums um drei Zehnerpotenzen. ESBL-bildende *E. coli* konnten aus der Vorgrubenprobe angezüchtet werden. Es gelang der Nachweis von $5,00 \times 10^1$ KbE/g ESBL-bildende *E. coli*, während eine Anzucht von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* aus den anderen Proben nicht möglich war.

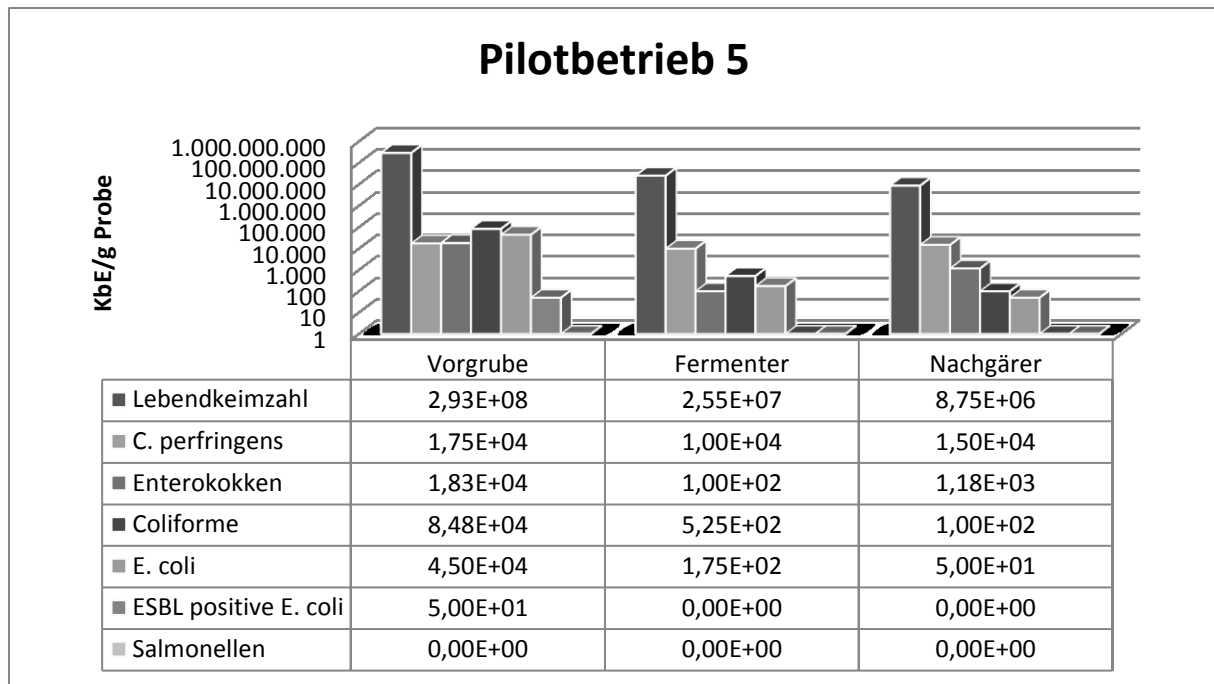


Abbildung 23: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 5

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.5 Pilotbetrieb 6

Die Proben von Pilotbetrieb 6 stammten aus dem Fermenter, dem Nachgärer und zwei parallel genutzten Endlagern.

Die aerobe Lebendkeimzahl lag in allen untersuchten Proben bei etwa 10^6 KbE/g Probe. Ein Nachweis von *C. perfringens* gelang aus Vorgrube und Fermenter mit etwa 10^4 KbE/g Probe. Im Endlager 1 gelang kein Nachweis von *C. perfringens* während in Endlager 2 *C. perfringens* mit $5,00 \times 10^3$ KbE/g Probe nachgewiesen wurde. Enterokokken konnten nur in der Fermenterprobe ($2,00 \times 10^3$ KbE/g Probe) nachgewiesen werden. Ein Nachweis von coliformen Keimen, *E. coli* und ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* gelang mit den verwendeten Untersuchungsmethoden aus keiner der Proben von Pilotbetrieb 6. (Abbildung 24)

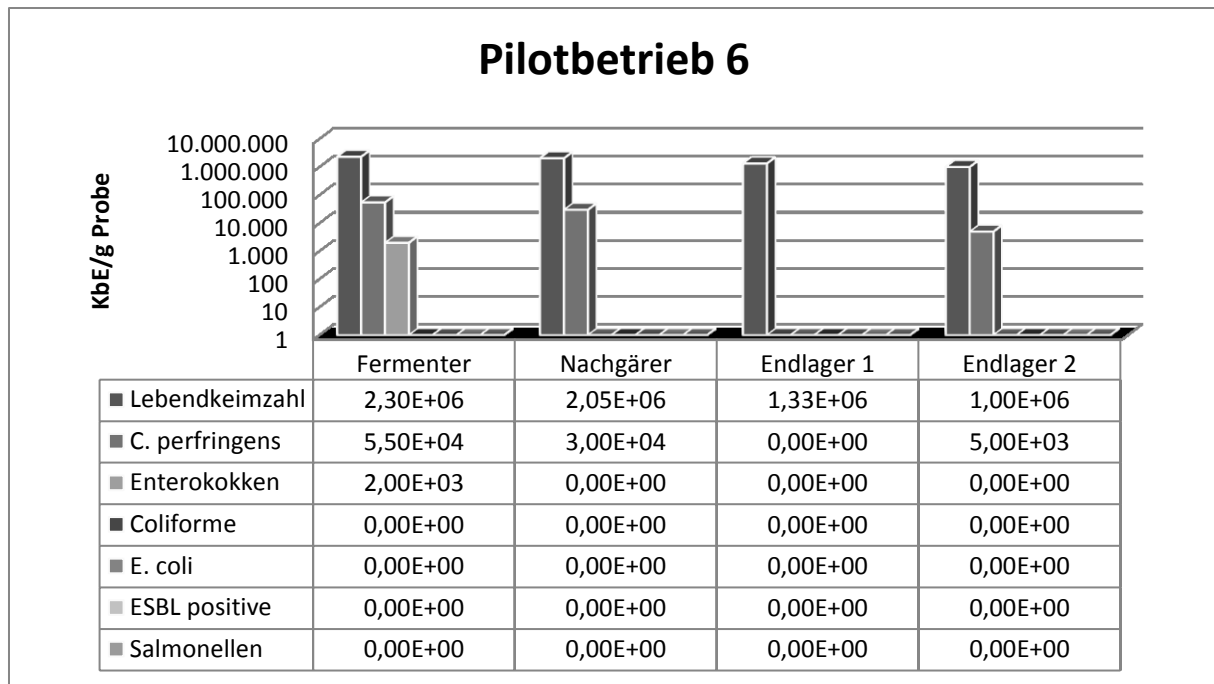


Abbildung 24: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 6

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.6 Pilotbetrieb 7

In Pilotbetrieb 7 wurden die untersuchten Proben aus dem Fermenter und dem Gärrestelager entnommen.

Die Untersuchungen des Fermenters und des Gärrestelagers ergaben eine aerobe Lebendkeimzahl von $1,35 \times 10^7$ bzw. $2,40 \times 10^6$. Der Gehalt an *C. perfringens* lag in beiden Proben bei 10^4 KbE/g Probe. Bei der Untersuchung auf Enterokokken waren in der Probe aus dem Fermenter $3,05 \times 10^5$ KbE/g Probe nachweisbar und in der Probe aus dem Gärrestelager lag der Gehalt bei $3,35 \times 10^4$ KbE/g Probe, was einer Reduktion von 1 \log_{10} -Stufe entspricht. Der Gehalt an coliformen Bakterien und *E. coli* betrug im Fermenter etwa 10^3 KbE/g Probe und im Gärrestelager etwa 10^2 KbE/g Probe, so dass es auch hier zu einer Reduktion um eine Zehnerpotenz kam. Ein Nachweis von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* war mit den verwendeten Untersuchungsmethoden in keiner der Proben möglich (Abbildung 25).

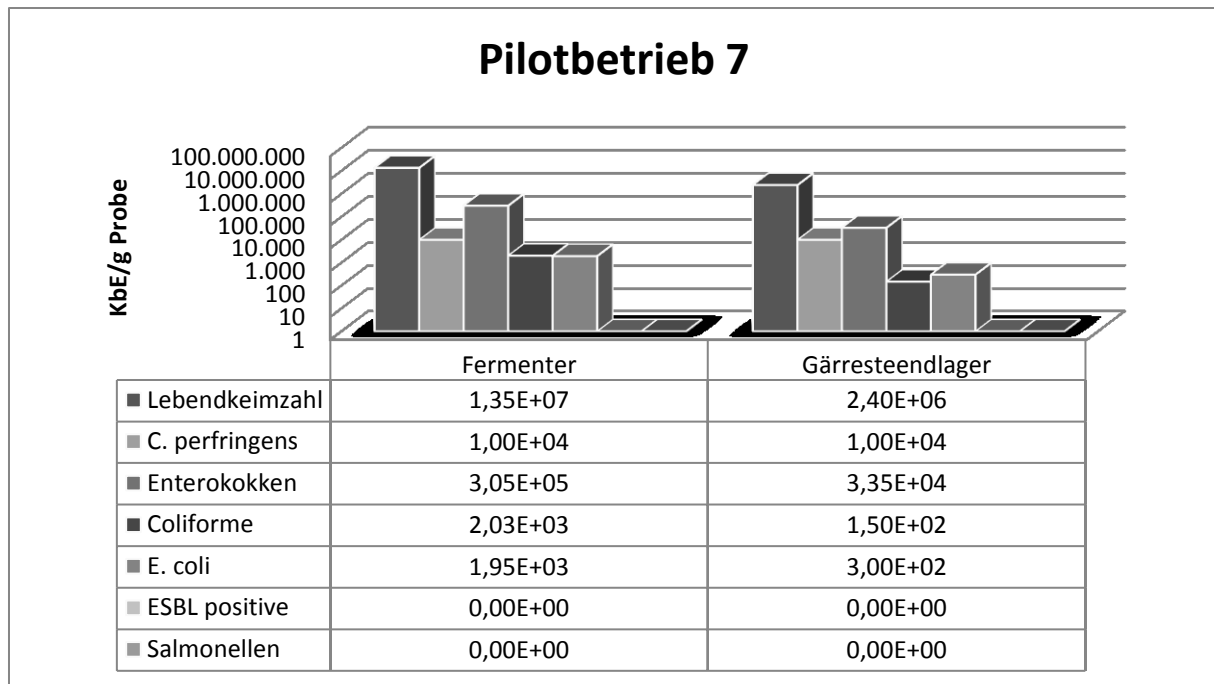


Abbildung 25: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 7

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.7 Pilotbetrieb 8

Aus der Biogasanlage von Pilotbetrieb 8 wurden Proben aus den zwei Fermentern dieser Anlage entnommen.

In beiden Fermenterproben war eine aerobe Lebendkeimzahl von ca. 10^6 KbE/g Probe nachweisbar. Der Gehalt an Enterokokken betrug in beiden Proben 10^4 KbE/g. Es waren in der Probe aus Fermenter 1 je 10^1 KbE/g coliforme Keime sowie *E. coli* nachweisbar, in der Probe aus Fermenter 2 konnten weder coliforme Keime noch *E. coli* nachgewiesen werden. Des Weiteren gelang aus der Probe von Fermenter 1 die Anzucht von $1,00 \times 10^2$ KbE/g ESBL-bildende *E. coli*. In keiner der Proben von Pilotbetrieb 8 konnte mit den verwendeten Untersuchungsmethoden *C. perfringens* nachgewiesen werden (Abbildung 26).

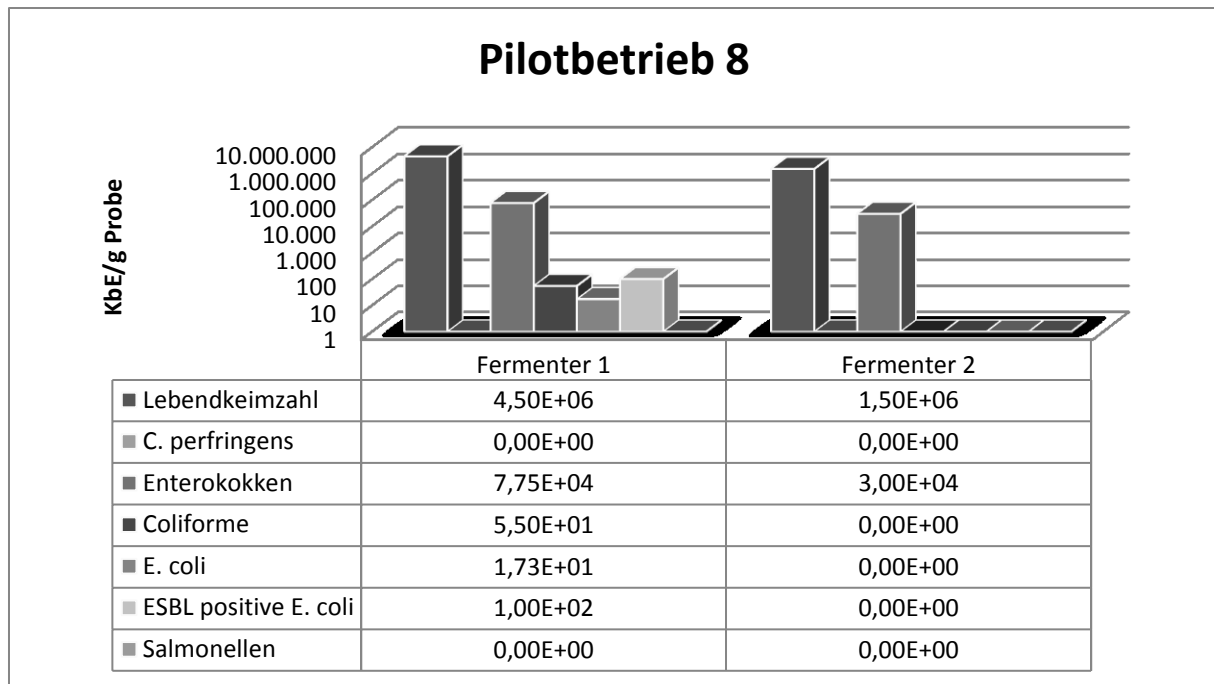


Abbildung 26: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 8

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.8 Pilotbetrieb 9a

Da der Pilotbetrieb 9 zwei Biogasanlagen an zwei verschiedenen Standorten unterhielt, wurden diese mit der Bezeichnung 9a und 9b versehen.

Von PB 9a wurden Proben aus den zwei vorhandenen Hydrolysestufen sowie beiden Fermentern entnommen. Da die Kompartimente jeweils parallel laufen und nicht zu zuordnen ist, aus welcher Hydrolysestufe in welchen Fermenter gepumpt wird, war ein Rückschluss auf eine Reduktion anhand der Keimzahlen in diesem Fall nicht möglich.

Die aerobe Lebendkeimzahl betrug in den Proben aus beiden Hydrolysestufen 10^8 KbE/g Probe (Abbildung 27). In beiden Fermenterproben war eine aerobe Lebendkeimzahl von 10^7 KbE/g nachweisbar. Der Gehalt an *C. perfringens* lag in allen Proben bei 10^5 KbE/g. Es waren in beiden Proben aus den Hydrolysestufen jeweils 10^6 KbE/g Enterokokken nachweisbar; in den Proben aus den Fermentern konnten 10^5 KbE/g nachgewiesen werden. Coliforme Bakterien wurden in der Probe aus Hydrolyse 1 mit einem Gehalt von $9,50 \times 10^6$ KbE/g nachgewiesen; in Hydrolyse 2 betrug die Keimmenge $1,40 \times 10^6$ KbE/g Probe. Der Gehalt an coliformen Keimen in beiden Fermenterproben lag bei 10^4 KbE/g. *E. coli* konnte in Hydrolyse 1 mit $1,73 \times 10^5$ KbE/g Probe nachgewiesen werden während in Hydrolyse 2 der Gehalt bei $2,30 \times 10^6$ KbE/g Probe lag. In beiden Fermentern wurden je 10^4 KbE/g *E. coli* nachgewiesen. ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* wurden aus allen Proben mit Ausnahme der Probe aus Fermenter I angezüchtet (Abbildung 28). In der Probe aus Hydrolyse 1 handelte es sich dabei um je 10^4 KbE/g *E. coli* und *Escherichia fergussonii*, sowie 10^3 KbE/g *Klebsiella oxytoca*. In

Hydrolysestufe 2 waren ebenfalls *E. coli* und *Escherichia fergussonii* nachweisbar, hier mit einem Gehalt von je 10^3 KbE/g. Des Weiteren wurde ein *Klebsiella oxytoca*-Gehalt von $5,00 \times 10^1$ KbE/g Probe nachgewiesen. *Klebsiella pneumoniae* sowie *Enterobacter aerogenes* konnten aus dieser Probe ebenfalls angezüchtet werden. Ihr Gehalt betrug $3,50 \times 10^2$ bzw. $5,00 \times 10^2$ KbE/g Probe. In der Probe aus Fermenter II gelang der Nachweis von $5,00 \times 10^1$ KbE *Enterobacter aerogenes*/g Probe.

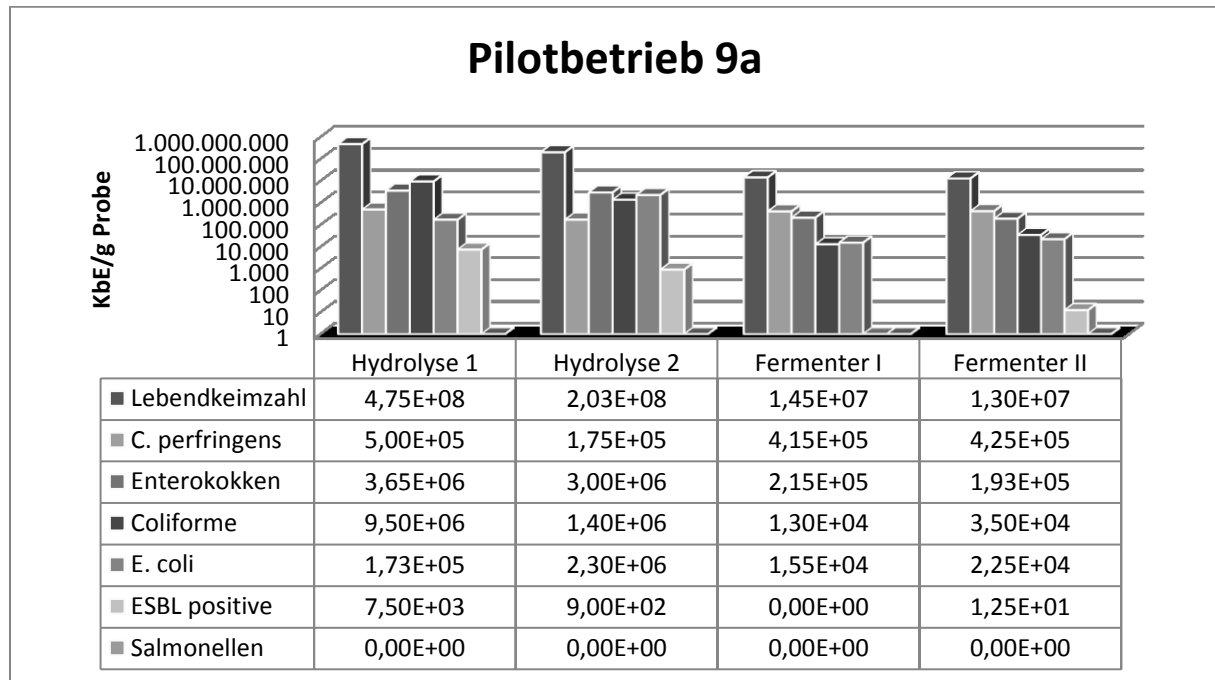


Abbildung 27: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 9a

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für 10^{Zahl}

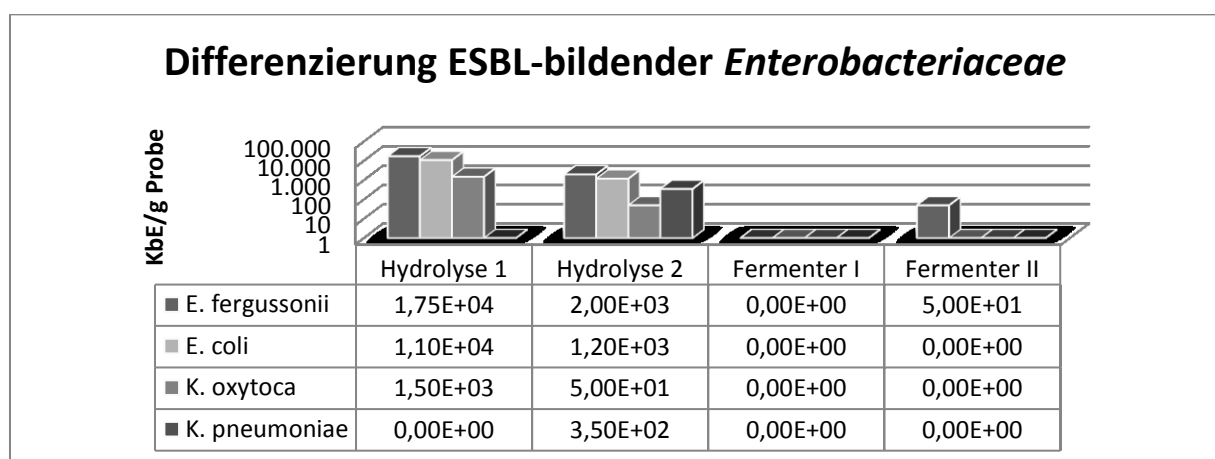


Abbildung 28: Ergebnisse der Identifizierung ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* für PB 9a

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für 10^{Zahl}

4.3.2.9 Pilotbetrieb 9b

Die Proben von PB 9b stammten aus der Hydrolysestufe und dem Fermenter.

Die Bestimmung der aeroben Lebendkeimzahl ergab in der Probe aus der Hydrolysestufe einen Gehalt von $7,75 \times 10^7$ KbE/g, im Fermenter konnte ein Gehalt von $3,58 \times 10^6$ nachgewiesen werden (Abbildung 29). Von *C. perfringens* konnten in beiden Proben 10^5 KbE/g nachgewiesen werden. Die Untersuchung auf Enterokokken ergab in der Hydrolysestufeprobe eine Keimmenge von $2,80 \times 10^5$ KbE/g Probe; $3,30 \times 10^4$ KbE/g konnten aus der Probe aus dem Fermenter angezüchtet werden. Der Nachweis von coliformen Bakterien der Hydrolysestufeprobe entsprach 10^4 KbE/g, und in der Fermenterprobe wurden 10^2 KbE/g Probe nachgewiesen. *E. coli* erreichte 10^5 KbE/g in der Hydrolysestufeprobe und reduzierte sich auf 10^3 KbE/g Probe aus dem Fermenter. ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* waren nur in der Probe aus der Hydrolysestufe nachweisbar: *E. coli* mit einem Gehalt von $1,00 \times 10^2$ KbE/g Probe und *Enterobacter aerogenes* mit einem Gehalt von $2,50 \times 10^1$ KbE/g Probe (Abbildung 30).

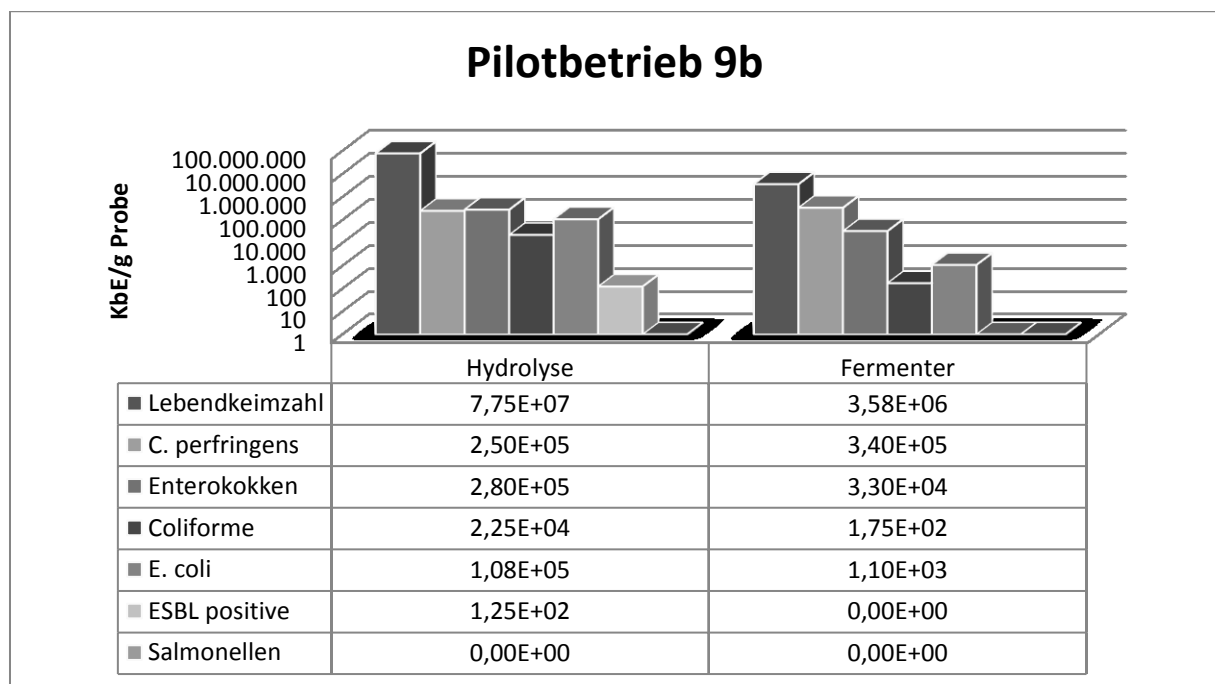


Abbildung 29: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 9b

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

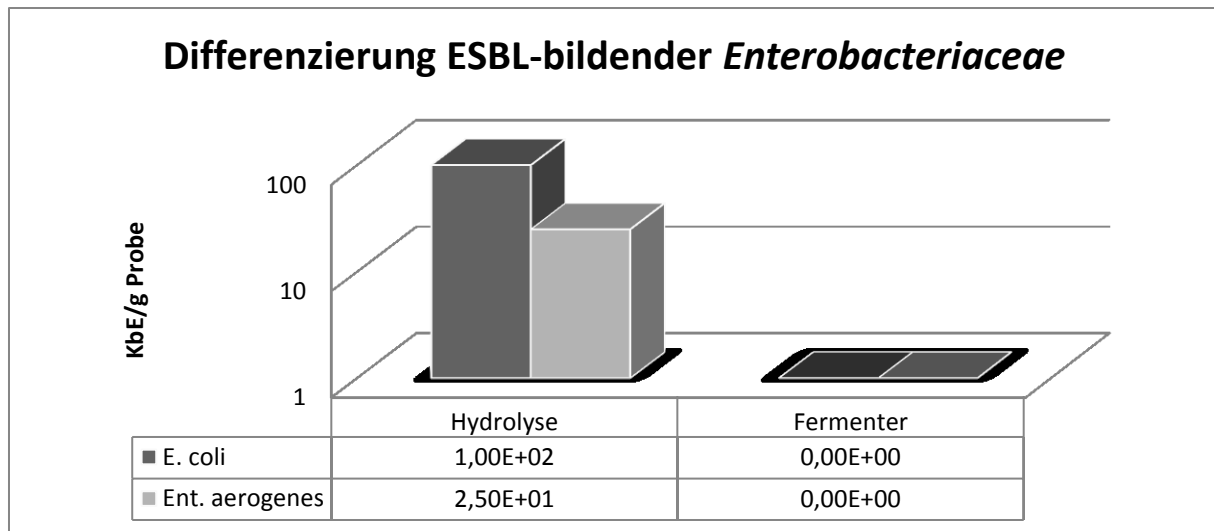


Abbildung 30: Ergebnisse der Identifizierung ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* für PB 9b

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.2.10 Pilotbetrieb 10

Bei den untersuchten Proben aus Pilotbetrieb 10 handelte es sich um Proben aus der Vorgrube, den zwei parallel laufenden Fermentern 1 und 2 sowie dem Nachgärer.

Die aerobe Lebendkeimzahl in der Vorgrube betrug $5,40 \times 10^7$ KbE/g Probe (Abbildung 31). Die Fermenterproben sowie die Probe aus dem Nachgärer wiesen eine aerobe Lebendkeimzahl von 10^6 KbE/g auf. Von *C. perfringens* konnte in der Vorgrube, dem Fermenter 2 sowie dem Nachgärer ein Gehalt von 10^4 KbE/g Probe nachgewiesen werden. Der Gehalt an *C. perfringens* lag in der Probe aus dem Fermenter 1 bei 10^5 KbE/g. Bei der Untersuchung auf Enterokokken wurden in der Vorgrubenprobe $4,48 \times 10^4$ KbE/g nachgewiesen. In beiden Fermentern lag der Gehalt an Enterokokken bei etwa 3×10^3 KbE/g und im Nachgärer wurden $8,00 \times 10^2$ KbE/g Probe nachgewiesen. Dieses entspricht einer Reduktion der Enterokokken um zwei Zehnerpotenzen. In der Vorgrubenprobe waren 10^4 KbE/g coliforme Keime nachweisbar während in beiden Fermentern 10^2 KbE/g Probe und im Nachgärer 10^1 KbE/g gefunden wurden. *E. coli* erreichte in der Probe aus der Vorgrube 10^5 KbE/g. Die Proben aus den Fermentern enthielten 10^3 KbE/g (Fermenter 1) und 10^4 KbE/g (Fermenter 2). Im Nachgärer wurden 10^2 KbE/g Probe nachgewiesen.

In drei von vier Proben des PB 10 wurden ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. Hierbei handelte es sich in allen Fällen um ESBL-bildende *E. coli*. In der Vorgrube waren $9,75 \times 10^3$ KbE/g Probe nachweisbar, in Fermenter 1 konnte ein Gehalt von $5,00 \times 10^1$ KbE/g festgestellt werden und in Fermenter 2 wurden $1,00 \times 10^2$ KbE/g nachgewiesen. In der Probe aus dem Nachgärer war mit den verwendeten Untersuchungsmethoden kein Nachweis von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* möglich.

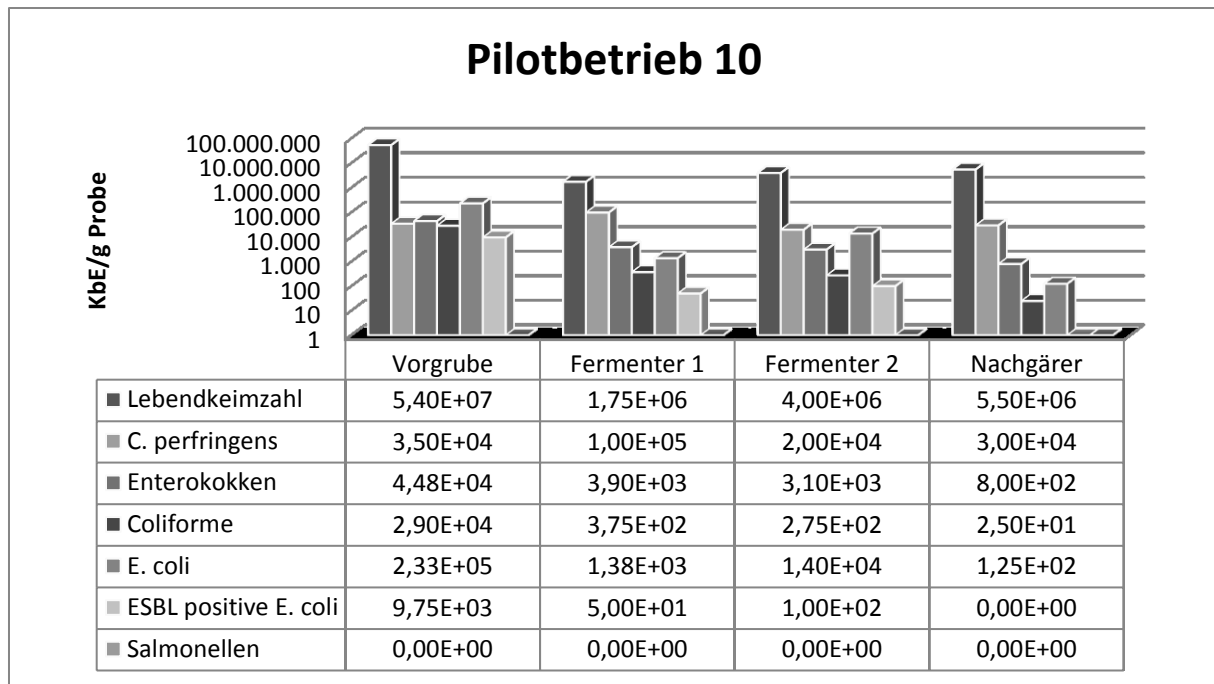


Abbildung 31: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 10

E = Exponent zur Basis 10, E+Zahl steht für $\times 10^{\text{Zahl}}$

4.3.3 Bestimmung des Toxintyps der *C. perfringens* Feldisolate mittels PCR

Es wurden alle mit dem RapID™ ANA II identifizierten *C. perfringens* Isolate in die PCR eingesetzt. Insgesamt 22 *C. perfringens*-Isolate wurden bei der bakteriologischen Untersuchung gewonnen und mittels PCR nach dem Protokoll von VAN ASTEN et al. (2009) untersucht. Alle 22 Proben waren dem *C. perfringens* Typ A zuzuordnen (Tabelle 22). Sechs der 22 Proben (27%) wiesen zudem das β_2 Toxin-Gen auf (Abbildung 32 und 33, Tabelle 22).

Tabelle 22: Auswertung der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR

Abbildung 30			
Bahn	Stamm/Isolat	Amplifikatgröße	Beurteilung
A	<i>C. perfringens</i> Typ A (DSM 756)	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
B	<i>C. perfringens</i> Typ B (ATCC 3626)	195 bp, 324 bp, 376 bp, 548 bp	Typ B, <i>cpb2</i> +
C	<i>C. perfringens</i> Typ C (NCTC 3180)	195 bp, 324 bp	Typ C, <i>cpb2</i> +
D	<i>C. perfringens</i> Typ D (ATCC 12917)	324 bp, 485 bp	<i>etx</i> fehlt
E	<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	272 bp, 324 bp, 548 bp	Typ E, <i>cpb2</i> +
1	GVG ELA <i>C. perf</i>	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
2	GVG A	324 bp	Typ A
3	GVG B	324 bp	Typ A
4	GF C	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
5	GF D	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +

Bahn	Stamm/Isolat	Amplifikatgröße	Beurteilung
6	GNG F	324 bp	Typ A
7	<i>C. perfringens</i> Typ D (NCTC 8504)	324 bp, 376 bp	Typ D
Abbildung 31			
A	<i>C. perfringens</i> Typ A (DSM 756)	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
B	<i>C. perfringens</i> Typ B (ATCC 3626)	195 bp, 324 bp, 376 bp, 548 bp	Typ B, <i>cpb2</i> +
C	<i>C. perfringens</i> Typ C (NCTC 3180)	195 bp, 324 bp	Typ C, <i>cpb2</i> +
D	<i>C. perfringens</i> Typ D (ATCC 12917)	324 bp, 485 bp	<i>etx</i> fehlt
E	<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	272 bp, 324 bp, 548 bp	Typ E, <i>cpb2</i> +
1	PB7-CP1	324 bp	Typ A
2	PB7-CP2	324 bp	Typ A
3	PB4-CP7	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
4	GEL 6	324 bp	Typ A
5	PB4-CP8	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
6	PB4-CP9	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
7	<i>C. perfringens</i> Typ D (ATCC 12917)	324 bp, 485 bp	<i>etx</i> fehlt
8	<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	272 bp, 324 bp, 548 bp	Typ E, <i>cpb2</i> +
9	PB4-CP1	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
10	PB4-CP2	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
11	PB4-CP3	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
12	PB4-CP4	324 bp	Typ A
13	PB4-CP5	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
14	PB4-CP6	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
15	PB7-CP3	324 bp	Typ A
16	PB6-CP8	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
17	PB6-CP2	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
18	GEL 10	324 bp	Typ A
19	<i>C. sordellii</i>	kein Amplifikat	entfällt
20	<i>C. bifermentans</i>	kein Amplifikat	entfällt
21	<i>C. subterminale</i>	kein Amplifikat	entfällt
22	<i>C. sporogenes</i>	kein Amplifikat	entfällt
23	<i>C. sporogenes</i>	kein Amplifikat	entfällt
24	<i>C. butyricum</i>	kein Amplifikat	entfällt
25	<i>C. difficile</i>	kein Amplifikat	entfällt

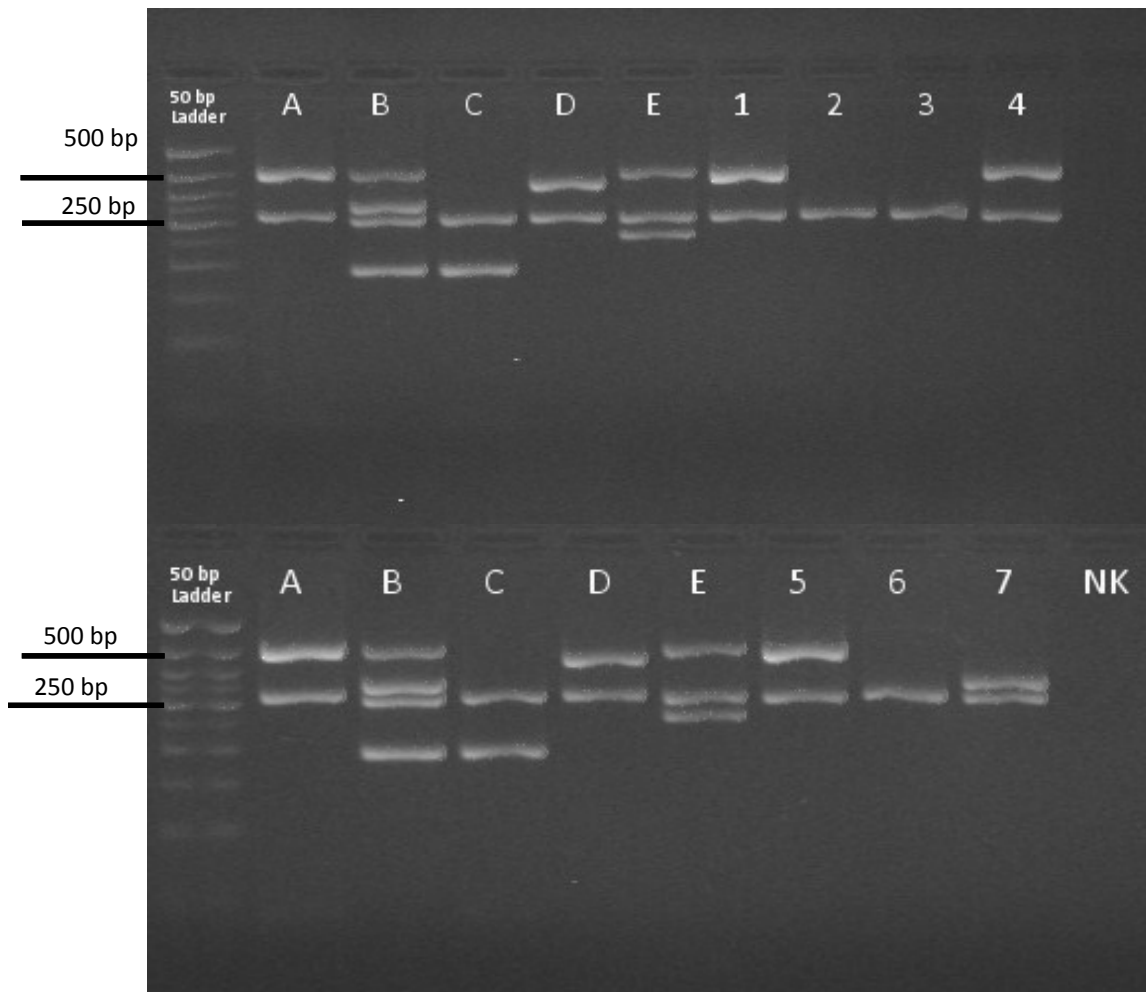


Abbildung 32: Auswertung der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR mit Feldisolaten im Agarosegel (3%)

A: *C. perfringens* Typ A (DSM 756); B: *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); C: *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); D: *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); E: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 1, 4, 5: *C. perfringens* Typ A, β_2 Toxin-Gen positiv; 2, 3, 6: *C. perfringens* Typ A; 7: *C. perfringens* Typ D (NCTC 8504); NK: Negativkontrolle

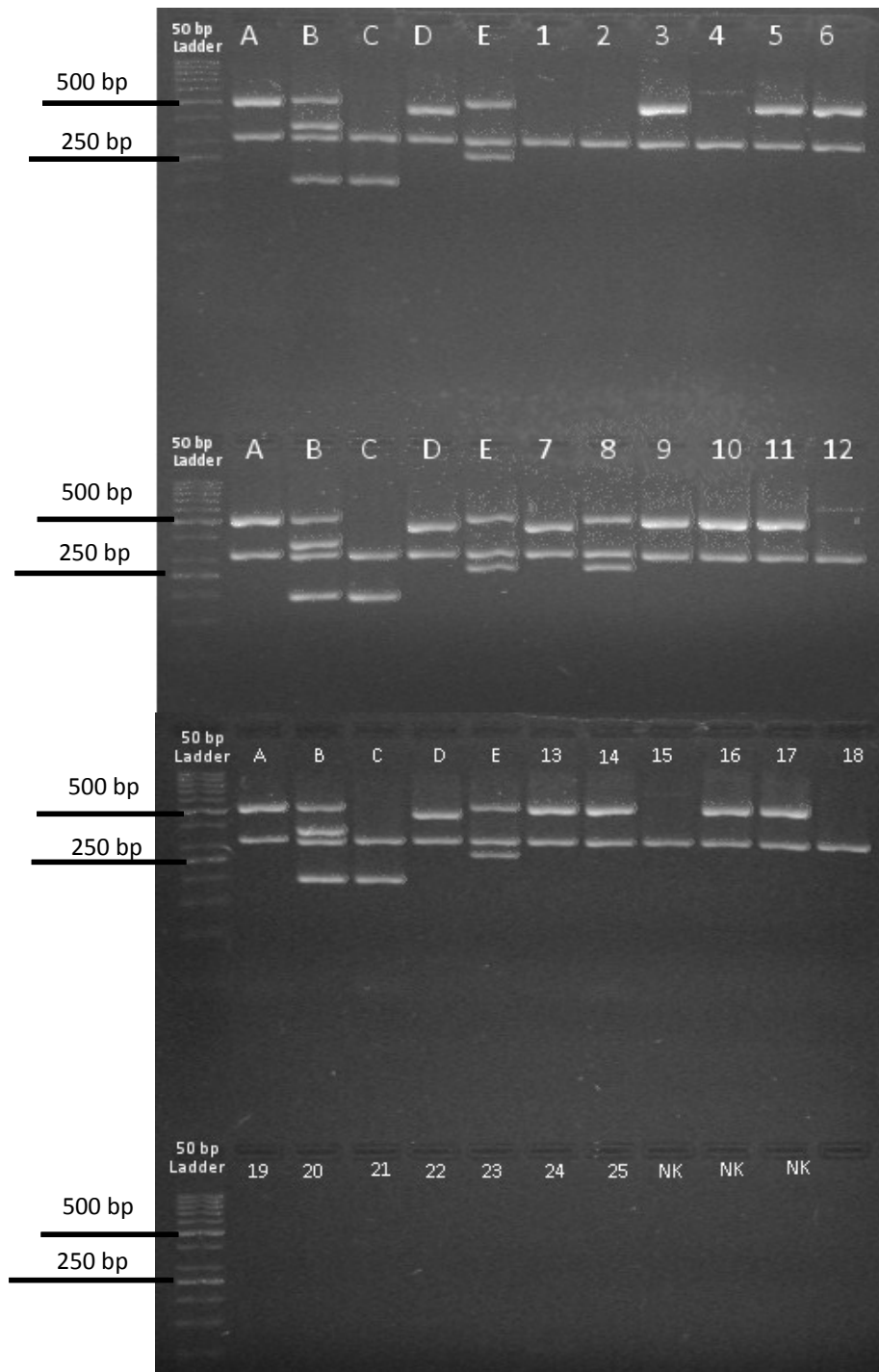


Abbildung 33: Auswertung der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR mit Feldisolaten im Agarosegel (3%)

A: *C. perfringens* Typ A (DSM 756); B: *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); C: *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); D: *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); E: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 1, 2, 4, 12, 15, 18: *C. perfringens* Typ A; 3, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17: *C. perfringens* Typ A, β_2 Toxin-Gen positiv; 7: *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); 8: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 19: *C. sordellii*; 20: *C. bifermentans*; 21: *C. subterminale*; 22, 23: *C. sporogenes*; 24: *C. butyricum*; 25: *C. difficile*; NK: Negativkontrolle

4.3.4 Untersuchung der Rückstellproben und Anreicherungen in TPYG-Bouillon auf *C. perfringens* mittels PCR

Das PCR-Protokoll nach VAN ASTEN et al. (2009) wurde auch für die Untersuchung aufgereinigter DNA aus Rückstellproben (native Gärreste und Gärsubstrate) sowie aus den Anreicherungen in TPYG-Bouillon verwendet. Bei der Auswertung der PCR-Ergebnisse im Agarosegel zeigte sich, dass der Einsatz von DNA aus nativem Gärrest und Gärsubstraten in der PCR zu einer unspezifischen Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen führte. Das Ergebnis einiger Proben ist in der Abbildung 34 dargestellt.

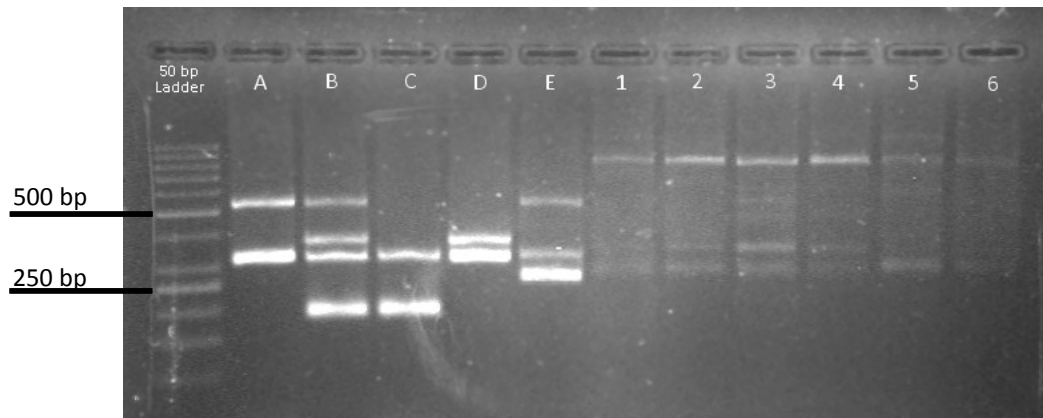


Abbildung 34: Auswertung der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR mit DNA aus nativem Gärrest und Gärsubstraten im Agarosegel (3%)

A: *C. perfringens* Typ A (DSM 756); B: *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); C: *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); D: *C. perfringens* Typ D (NCTC 8504); E: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 1: Fermenter 1 PB 8; 2: Fermenter 2 PB 8; 3: Fermenter PB 3; 4: Nachgärer PB 3; 5: Fermenter PB 7; 6: Gärresteendlager PB 7

Zur Optimierung der PCR wurde deshalb ein touch-down Protokoll mit erhöhter Stringenz in den Amplifikationsbedingungen eingesetzt. Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, führte dieses Protokoll nicht zu der gewünschten Reduktion der unspezifischen Amplifikate, so dass dieses PCR-Protokoll nicht geeignet ist, *C. perfringens* direkt aus DNA von Gärresten bzw. Gärsubstraten eindeutig nachzuweisen.

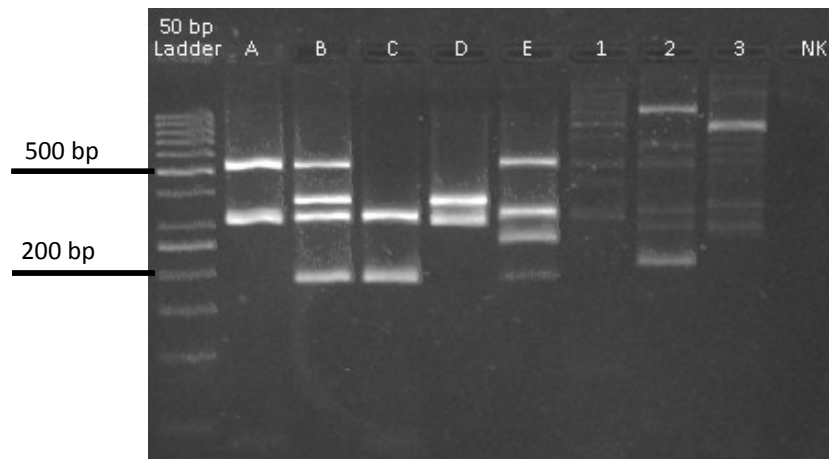
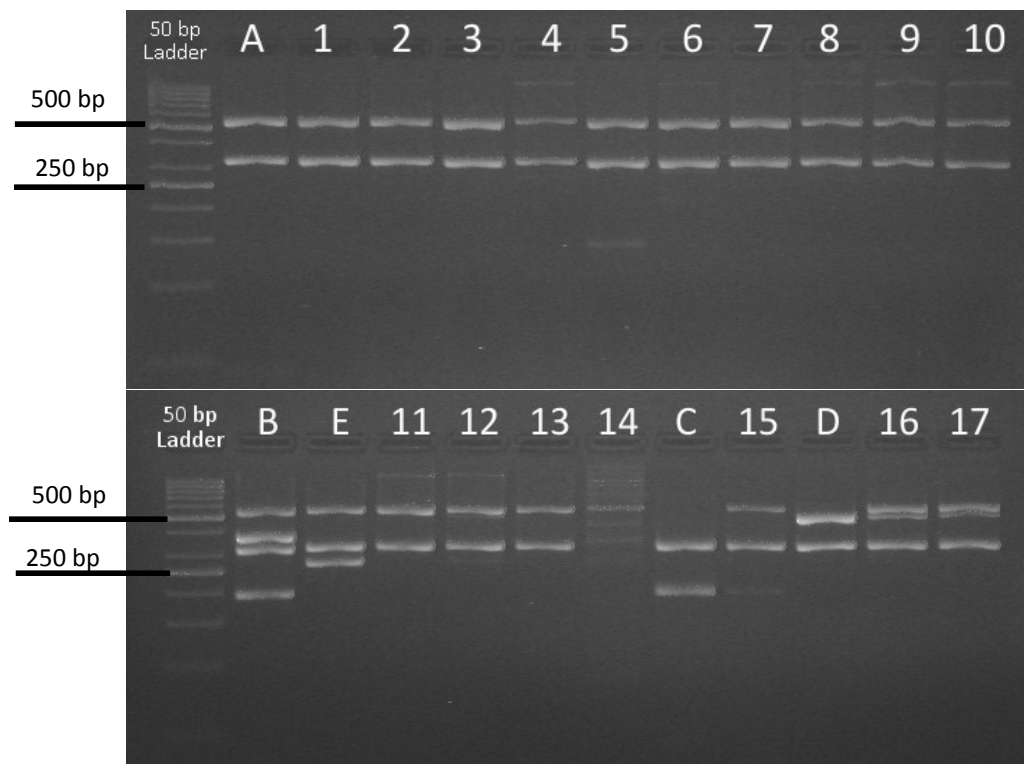


Abbildung 35: Auswertung der *C. perfringens* Toxin-Gen touch-down PCR im Agarosegel (3%)

A: *C. perfringens* Typ A (DSM 756); B: *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); C: *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); D: *C. perfringens* Typ D (NCTC 8504); E: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 1: Vorgrube PB 10; 2: Fermenter PB 6; 3: Fermenter PB 3; NK: Negativkontrolle

DNA-Proben aus 17 Anreicherungen in TPYG-Bouillon wurden zum Nachweis von *C. perfringens* in die Toxin-Gen PCR eingesetzt. Alle Proben ergaben ein Bandenmuster, das eindeutig einem *C. perfringens* Toxintyp zuzuordnen war (Tabelle 23). Alle in der bakteriologischen Untersuchung mit TSC Agar negativen Proben (n=8) erwiesen sich in der PCR als positiv für *C. perfringens*. In 14 von 17 Proben war *C. perfringens* Typ A mit β_2 Toxin-Gen nachweisbar. Bei zwei Proben (Abbildung 34, Proben 16 und 17) war nicht eindeutig, ob es sich bei der oberen Bande um eine Doppelbande handelt oder hier die Banden für *cpb2* (548 bp) und *cpe* (485 bp) vorliegen, die durch die Gelelektrophorese nicht ausreichend voneinander getrennt wurden. In Probe 15 konnte *C. perfringens* Typ C mit β_2 Toxin-Gen identifiziert werden (Abbildung 36). Wie in Abbildung 36 zu sehen, kam es beim Einsatz von DNA aus den angereicherten Proben in TPYG-Bouillon vereinzelt zu einer unspezifischen Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen (Proben 4, 6, 8-12 bei >1000 bp; Probe 5 bei ca. 150 bp). Probe 14 beinhaltet DNA, die aus nativem Gärrest aufgereinigt wurde.



**Abbildung 36: Auswertung der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR mit DNA aus TPYG-Bouillon
(Agarosegel 3%)**

A: *C. perfringens* Typ A (DSM 756); B: *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); C: *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); D: *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); E: *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); 1-13: *C. perfringens* Typ A, β_2 Toxin-Gen positiv, 14: nativer Gärrest mit unspezifischen Banden; 15: *C. perfringens* Typ C, β_2 Toxin-Gen positiv; 16, 17: *C. perfringens* Typ A, β_2 Toxin-Gen positiv und/oder Enterotoxin-Gen positiv

Tabelle 23: Auswertung der *C. perfringens* Toxin-Gen PCR mit DNA aus TPYG-Bouillon

Abbildung 34			
Bahn	Stamm/Isolat	Amplifikatgröße	Beurteilung
A	<i>C. perfringens</i> Typ A (DSM 756)	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
B	<i>C. perfringens</i> Typ B (ATCC 3626)	195 bp, 324 bp, 376 bp, 548 bp	Typ B, <i>cpb2</i> +
C	<i>C. perfringens</i> Typ C (NCTC 3180)	195 bp, 324 bp	Typ C,
D	<i>C. perfringens</i> Typ D (ATCC 12917)	324 bp, 485 bp	<i>cpa</i> , <i>cpe</i> , <i>etx</i> fehlt
E	<i>C. perfringens</i> Typ E (ATCC 27324)	272 bp, 324 bp, 548 bp	Typ E, <i>cpb2</i> +
1	1-19-AN	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
2	2-22-AN	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
3	3-25-AN	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
4	A1-7-AN	324 bp, 548 bp, > 1000bp	Typ A, <i>cpb2</i> +
Bahn	Stamm/Isolat	Amplifikatgröße	Beurteilung

5	EVG-40-AN	150 bp, 324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
6	JF-28-AN	324 bp, 548 bp, > 1000bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
7	JEL1-34-AN	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
8	GEL-16-AN	324 bp, 548 bp, > 1000bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
9	F1-1-AN	324 bp, 548 bp, > 1000bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
10	F2-4-AN	324 bp, 548 bp, > 1000bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
11	AF-58-AN	324 bp, 548 bp, > 1000bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
12	BF-67-AN	324 bp, 548 bp, > 1000bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
13	GF-82-AN	324 bp, 548 bp	Typ A, <i>cpb2+</i>
14	VG-91-RP	nicht auswertbar	entfällt
15	A2-10-AN	195 bp, 324 bp, 548	Typ C, <i>cpb2+</i>
16	CH-76-AN	324 bp, 485 bp und/oder 548 bp	Typ A, <i>cpe+</i> und/oder <i>cpb2+</i>
17	B1-13-AN	324 bp, 485 bp und/oder 548 bp	Typ A, <i>cpe+</i> und/oder <i>cpb2+</i>

4.3.5 Clostridium botulinum PCR

Alle in TPYG-Bouillon angereicherten Proben wurden mittels PCR nach dem Protokoll von HILL et al. (2010) auf *C. botulinum* untersucht.

Mit der NTNH-Gen PCR konnten keine Toxin-bildenden *C. botulinum* in den DNA-Proben aus den Anreicherungen nachgewiesen werden. In Abbildung 37 ist exemplarisch die Auswertung der NTNH-Gen PCR mit 10 DNA-Proben dargestellt. *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472) diente als Positivkontrolle und ergab ein Amplifikat in der erwarteten Größe von 101 bp. Die weiteren Auswertungen im Agarosegel sind dem Anhang 9.3, Abbildungen 61 – 66 zu entnehmen.

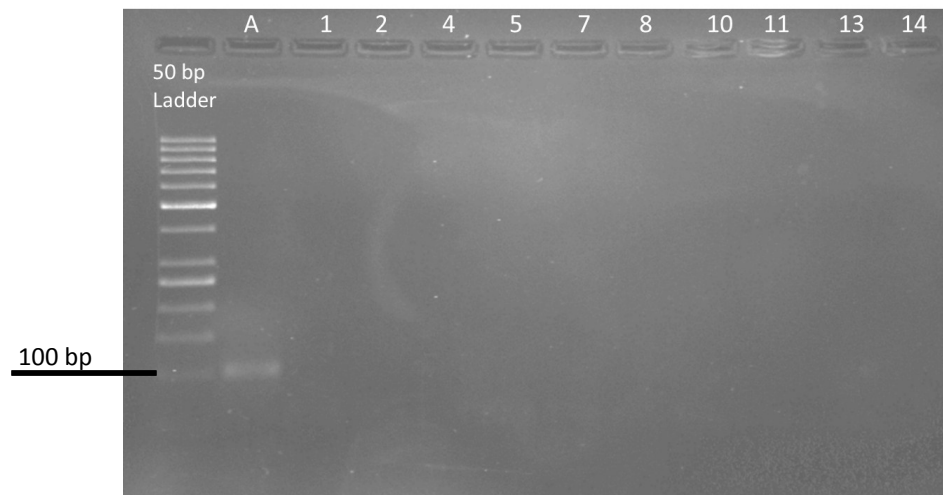


Abbildung 37: Auswertung der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472), 1: Anreicherung von F1-1-AN; 2: Anreicherung von F1-2-AN; 4: Anreicherung von F2-4-AN; 4: Anreicherung von F2-5-AN; 7: Anreicherung von A1-7-AN; 8: Anreicherung von A1-8-AN; 10: Anreicherung von A2-10-AN; Anreicherung von 11: Anreicherung von A2-11-AN; 13: Anreicherung von B1-13-AN; 14: Anreicherung von GEL-16-AN

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, bakteriologische und molekularbiologische Methoden zum Nachweis ausgewählter Indikatororganismen aus Gärresten und Gärsubstraten von Biogasanlagen zu etablieren und diese auf ihre Praxistauglichkeit zu testen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Gärrest- sowie Gärsubstratproben von zehn Biogasanlagen aus neun Betrieben in Sachsen entnommen und die mikrobiologische Belastung der Proben hinsichtlich der vorgegebenen Indikatororganismen ermittelt. Darüber hinaus ermöglichten die Ergebnisse der Untersuchungen eine Einschätzung des bakteriologischen Risikopotentials dieser Proben, die unter anderem zur Düngung verwendet werden können.

5.1 Beurteilung der verwendeten Methoden für den Nachweis von Bakterien aus Gärresten und Gärsubstraten

Die Matrix Gärsubstrat bzw. Gärrest hatte einen Einfluß auf das bakteriologische Untersuchungsergebnis. Bei der Aufbereitung der Matrix für die Beimpfung mit definierten Keimmengen fiel auf, dass die Begleitflora in der Matrix sehr widerstandsfähig ist und in hohen Mengen vorhanden war. Der als Matrix verwendete Gärrest musste mehrfach autoklaviert werden, bevor die Sterilitätskontrolle negativ ausfiel. Eine Verdrängung der Ziel-Bakterien ist durch die starke Begleitflora in nativem Gärrest und Gärsubstrat nicht auszuschließen und führt gegebenenfalls zu falschen Untersuchungsergebnissen. Gestützt wird diese Annahme durch die Studie von SCHAUSS et al. (2015), die berichtet, dass ESBL-bildende *E. coli* beim Direktausstrich von Gärresten von der Begleitflora unterdrückt und somit fälschlicherweise ein negatives Ergebnis dokumentiert wurde. Der Einfluß toxischer Effekte der Matrix auf das Untersuchungsergebnis kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,5 bis 7,0 wird als hilfreich angesehen (ANON. 2007b). Obwohl eine pH-Wert-Anpassung in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt wurde und toxische Effekte nicht ausgeschlossen werden können, gelang ein sicherer und reproduzierbarer Nachweis der Indikatorkeime aus artifiziell beimpfter Matrix. Bei der Überprüfung der Praxistauglichkeit zeigte sich vor allem bei der Verwendung der chromogenen Nährmedien sowie bei Enterococcus Selektivagar und TSC Agar, dass die Begleitflora im Gärrest bzw. Gärsubstrat erhebliche Auswirkungen auf die Auswertbarkeit des Ergebnisses hatte. Sie muss deshalb durch qualifiziertes Personal erfolgen und durch weiterführende biochemische und serologische Untersuchungen bestätigt werden. Die hier vorgestellten Nachweismethoden für die Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten sind als beispielhaft für eine Untersuchung von Proben aus Biogasanlagen anzusehen. Sie stellen keinesfalls einen Ersatz für bereits bestehende, z.T. gesetzlich vorgeschriebene Untersuchungsmethoden, wie z.B. für den Nachweis von Salmonellen in Kotproben von Nutztieren (ANON. 1991), dar.

Für den bakteriologischen Nachweis von *E. coli* sowie coliformen Keimen standen der Tergitol 7 Lactose TTC Agar sowie *Brilliance*TM *E. coli*/Coliform Selektiv Agar zur Auswahl. TTC Agar war nach der DIN EN ISO 9308-1:2001-07 (ANON. 2001) für den Nachweis und die Keimzahlbestimmung von *E. coli* und coliformen Keimen mittels Membranfiltrationsverfahren vorgeschrieben. Das im Agar enthaltene Tergitol-7 hemmt das Wachstum grampositiver Keime und unterdrückt das Schwärmen von *Proteus* spp. wodurch der Nachweis von *E. coli* und Coliformen begünstigt wird. Der *Brilliance*TM *E. coli*/Coliform Selektiv Agar enthält zwei chromogene Substrate, die zum Nachweis der β -Galactosidase- und β -D-Glucuronidase-Aktivität dienen. *E. coli* exprimiert i.d.R. beide Enzyme und wächst auf diesem Agar in violetten Kolonien. Coliforme Keime können nur das chromogene Substrat der β -Galactosidase spalten und wachsen als rosa Kolonien. Das Wachstum grampositiver Begleitflora wird durch den Zusatz von Natriumlaurylsulfat unterdrückt. Die neue DIN EN ISO 9308-1:2014-12 (ANON. 2014b) führt anstelle des TTC Agars die Verwendung eines chromogenen Nährbodens auf dem Wirkungsprinzip der beiden vorangehend genannten Enzyme an.

Die Nachweisgrenze des Tergitol 7 Lactose TTC Agars lag bei 38 KbE *E. coli*/ml. Im Vergleich dazu ergaben die Versuche mit *Brilliance*TM *E. coli*/Coliform Selektiv Agar eine Nachweisgrenze von 5 KbE/ml. 1 m³ Gärrest entspricht dem Gewicht von etwa 1 t, deshalb entspricht das Ergebnis pro ml dem Ergebnis pro g Gärrest (KTBL 2013). In der VO (EU) Nr. 142/2011 (ANON. 2011a) Anhang V Kapitel III Abschnitt 3 „Normen für Fermentationsrückstände und Kompost“ Buchstabe 1b) ist festgesetzt, dass das Untersuchungsergebnis einer Probe als zufriedenstellend gilt, wenn in allen Proben mit einem Gewicht von je 1 g die Keimzahl nicht höher als 10³ ist (ANON. 2011a). Somit sind beide Nährböden als sensitive Verfahren anzusehen und geeignet, um einen sicheren Nachweis zu führen. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen falsch-positiven Ergebnisse für *E. coli* v.a. durch *Klebsiella oxytoca* bei Trinkwasseruntersuchungen auf TTC Agar (BONADONNA et al. 2007) wurde für die weiteren Untersuchungen in dieser Studie der *Brilliance*TM *E. coli*/Coliform Selektiv Agar gewählt. Bei der Untersuchung der Feldproben trat hier der Fall auf, dass einige Kolonien aufgrund ihrer Färbung nicht definitiv als *E. coli* bzw. coliforme Bakterien zu identifizieren waren. Vereinzelt änderte sich auch die Farbe der Kolonie von rosa zu violett nach 48 h. Dieses kann bei subletal geschädigten *E. coli* der Fall sein, weshalb sich ein Ablesen der Platten nach 48 h empfiehlt. Zu beachten ist auch, dass nur 94-96% der *E. coli* β -D-Glucuronidase-positiv sind. Manche *E. coli*-Stämme (z.B. O157:H7) sind β -D-Glucuronidase-negativ (KILLIAN und BÜLOW 1976), weshalb sie nicht als *E. coli* identifiziert werden. Im Zweifelsfall muss eine weiterführende Untersuchung mit biochemischer und serologischer Differenzierung erfolgen.

Zum Nachweis von Salmonellen wurden drei Nährböden evaluiert: *Brilliance*TM Salmonella Agar, XLD und XLT4 Agar. *Brilliance*TM Salmonella Agar erlaubt eine verbesserte Identifizierung von *Salmonella* spp. (inklusive Laktose-positiver Salmonellen) aus unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien wie Lebensmittel oder klinische Proben. Der Agar enthält zwei chromogene Stoffe, die den Enzymen Caprylat-Esterase und beta-Glukosidase als Substrate dienen. Die Caprylat-Esterase kommt bei allen Salmonellen vor. Darüber hinaus enthält der Agar Substanzen für die Inhibition von *E. coli*, *Proteus* spp. und Pseudomonaden. Eingesetzt werden kann dieser Agar gemäß EN ISO 6579:2002+A1:2007-10 als Medium der Wahl neben XLD Agar (OXOID 2010a; ANON. 2007c). Darüber hinaus wurde seine Verwendung für die Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln sowie Umweltproben auf Salmonellen mittels der sogenannten OXOID Salmonella PreciTMs Methode durch die AFNOR gemäß ISO 16140:2003 vergleichend zur Standardmethode nach ISO 6579:2002 validiert (OXOID 2010b). XLD Agar dient der Isolierung von Shigellen und Salmonellen aus klinischem Untersuchungsmaterial und Lebensmitteln. Nach EN ISO 6579:2002+A1:2007-10 ist er für den Nachweis von Salmonellen in Lebens- und Futtermitteln vorgegeben (ANON. 2007c). Das Prinzip des Nährbodens beruht auf der Xylose-Verwertung, Lysin-Decarboxylierung und Schwefelwasserstoff-Bildung. Als Inhibitor ist Desoxycholat enthalten, dessen eingesetzte Konzentration die Hemmung von coliformen Bakterien erlaubt, ohne Shigellen und Salmonellen im Wachstum zu hindern. XLT4 Agar ist ein selektives Medium für die Isolierung und Identifizierung von Salmonellen aus klinischen Proben, Umweltmaterialien und Lebensmitteln. MILLER et al. (1991) haben dieses Medium für den Nachweis von Salmonellen aus Umweltproben von Geflügelbeständen evaluiert und kamen zu dem Ergebnis, dass v.a. das Wachstum von *Proteus*, Pseudomonaden und *Providentia* stark gehemmt wird. Zudem konnten sie *Salmonella* und *Citrobacter* spp. eindeutig voneinander differenzieren.

Die mittels Probitanalyse ermittelten Nachweisgrenzen lagen bei der Verwendung von *S. Typhimurium* bei 8 KbE/ml (*Brilliance*TM Salmonella Agar, XLD Agar) und 9 KbE/ml (XLT4 Agar). Im Vergleich dazu ergaben die Versuche mit *S. Enteritidis* Nachweisgrenzen von 9 KbE/ml (*Brilliance*TM Salmonella Agar), 18 KbE/ml (XLD Agar) und 90 KbE/ml (XLT4 Agar). Da *S. Typhimurium* (ATCC 14028) als Referenzstamm für alle drei untersuchten Nährmedien vom Hersteller angegeben wird, muß angenommen werden, dass die Unterschiede in den Nachweisgrenzen aus serovarspezifischen Wachstumsunterschieden resultieren.

Deutschlandweit waren im Jahr 2013 0,62% der bakteriologisch untersuchten Rind- und Schweinefleischproben Salmonellen-positiv (BFR 2015). In der akuten Phase der *S. Typhimurium*-Infektion beim Schwein werden 10^5 bis 10^7 KbE/g ausgeschieden. Bis zu 10^2 KbE/g Kot sind mehrere Wochen nach einer artifiziellen Infektion noch zu erwarten (GUTZMANN et al. 1976). Ausgehend von 10^2 Salmonellen/g Kot und unter der Annahme,

dass 1% der Gülle Salmonellen enthält, ergibt sich ein Gehalt von $1,6 \times 10^9$ Salmonellen im Biogasanlagen-Fermenter (Arbeitsvolumen 1.500 m^3), wenn das Substrat aus 80% Gülle besteht. Dieses entspricht ca. 10^6 Salmonellen in 1 Liter Fermenterinhalt und 10 Salmonellen in 100 µl aufbereiteter Probe nach dem hier angewendeten Nachweisverfahren. *Brilliance*TM Salmonella Agar, XLD sowie XLT4 Agar erlauben demzufolge einen sicheren Nachweis von *S. Typhimurium* und könnten zur Einhaltung der Vorgaben nach VO (EU) Nr. 142/2011 (ANON. 2011a) für den Salmonellen-Nachweis eingesetzt werden. Im Hinblick auf *S. Enteritidis* kann der Nachweis geringer Keimzahlen in der Probe bei der Verwendung von XLT4 nicht als gesichert angesehen werden. XLT4 wurde trotz der nicht zufrieden stellenden Ergebnisse für *S. Enteritidis* als zweiter Nährboden gewählt, da er für den Nachweis von Salmonellen aus Proben mit starker Begleitflora entwickelt wurde (MILLER 1991), die auch bei Gärsubstraten und Gärresten zu erwarten war.

Bei der Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten wies der *Brilliance*TM Salmonella Agar in einigen Fällen nach 48 h *Salmonella*-verdächtige Kolonien auf, obwohl der als Kontrolle mitgeführte XLT4 Agar keine Salmonellen-verdächtigen Kolonien zeigte. Dieses kann z.B. durch das Wachstum von H_2S -negativen Salmonellen auf dem XLT4 Agar bedingt sein, die keine charakteristische Schwarzfärbung aufweisen. Hier stellten sich die verdächtigen Kolonien *Brilliance*TM Salmonella Agar nach der biochemischen Differenzierung als *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus* und *Providentia rettgeri* heraus, alles Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae*. Es ist bekannt, dass *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Proteus* das Enzym Caprylat-Esterase, das für die charakteristische violette Koloniefarbe der Salmonellen sorgt, ebenfalls besitzen können (COOKE et al. 1999). Entsprechende Literaturhinweise zu *Citrobacter* und *Providencia rettgeri* wurden nicht gefunden. Gemäß Angaben des Herstellers wächst *Citrobacter* auf *Brilliance*TM Salmonella Agar in farblosen Kolonien, da beide Enzyme, Esterase und beta-Glukosidase, nicht gebildet werden (OXOID 2003). In der Produktbeschreibung zu Salmonellen-Ident-Agar (Merck Millipore), der ebenfalls chromogene Substrate nutzt, sind Salmonellen mintgrün und *Citrobacter amalonaticus* als kleine, blau-türkise Kolonien beschrieben während andere *Citrobacter* spp. elfenbeinfarbig aussehen. Davon abgeleitet kann daher angenommen werden, dass verschiedene *Citrobacter* spp. auf *Brilliance*TM Salmonella Agar ebenfalls eine unterschiedliche Koloniefarbe ausbilden könnten, auch wenn dieses vom Hersteller nicht angegeben ist. Somit ist ein Wachstum von Kolonien, die phänotypisch der Angabe des Herstellers bezüglich des Wachstums von Salmonellen auf *Brilliance*TM Salmonella Agar entsprechen, immer durch eine weiterführende Untersuchung zu bestätigen. Dieses ist im Produktinformationsblatt des Herstellers entsprechend aufgeführt (OXOID 2003). Der Hersteller empfiehlt zudem eine selektive Anreicherung der Proben, um kompetitive Bakterien zu inhibieren. Durch eine vorherige Anreicherung der Proben hätte somit das Wachstum der *Salmonella*-verdächtigen Kolonien von *Citrobacter* spp. und *Providentia*

gegebenenfalls vermieden werden können. Darüber hinaus fiel bei der Verwendung des *Brilliance*TM Salmonella Agar eine unspezifische Verfärbung des gesamten Nährbodens auf. Dieses trat vor allem bei wenig verdünnten Proben auf. Im Produkt-Informationsblatt des Herstellers wird in dem Punkt „Einschränkung des Testverfahrens“ darauf hingewiesen, dass diese Verfärbungen durch Kotbestandteile hervorgerufen werden können (OXOID 2003).

Für die Etablierung des Enterokokken-Nachweises fiel die Auswahl auf Slanetz Bartley Agar und Enterococcus Selektivagar. Slanetz und Bartley Agar ist ein selektiver Nährboden für den Nachweis und die Koloniezahlbestimmung von Enterokokken, der in der Trinkwasserverordnung 2001 (ANON. 2013b) und der DIN EN ISO 7899-2:2000-11 für das Membranfiltrationsverfahren vorgeschrieben ist (ANON. 2000). Nach BURKWALL und HARTMAN (1964) eignet er sich auch für den Direktausstrich von Lebensmittelproben. Der Enterococcus Selektivagar wird gemäß Trinkwasserverordnung 2001 (ANON. 2013b) und DIN EN ISO 7899-2:2000-11 zur Bestätigung verdächtiger Kolonien auf dem Slanetz-Bartley Agar eingesetzt (ANON. 2000). Die ermittelte untere Nachweisgrenze lag für beide Selektivnährmedien bei 11 KbE/ml. In den Normen für Fermentationsrückstände und Kompost nach VO (EU) Nr. 142/2011 in Anhang V, Kapitel III, Abschnitt 3, Nr. 1b) ist festgelegt, dass als zufriedenstellend gilt, wenn in 1 g Probe nicht mehr als 10^3 *Enterococcaceae* nachgewiesen werden können (ANON. 2011a). Da Enterokokken physiologisch in hohen Keimzahlen im Kot von Nutztieren vorkommen, erlauben beide Nährmedien einen sicheren Nachweis. Aufgrund der Koloniegröße nach 24 h Bebrütung bei 37°C und der somit besseren Auswertbarkeit wurde zunächst der Enterococcus Selektivagar für die Untersuchung der Proben aus den Biogasanlagen ausgewählt. Bereits zu Beginn der Untersuchung von nativen Proben stellte sich heraus, dass durch die in den Proben enthaltene Begleitflora eine Auswertung der Platten nicht möglich war. Der Nährboden hatte sich nach 24 h Inkubation durchgehend schwarz verfärbt, wodurch eine Identifizierung von Enterokokken anhand ihres charakteristischen schwarz-braunen Hofes um die Kolonie nicht durchgeführt werden konnte. Eine Inkubation bei 44°C hätte die Selektivität dieses Nährmediums für Enterokokken erhöht und zusätzlich die Begleitflora unterdrückt, dieses war jedoch aus labortechnischen Gründen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Untersuchungen auf Slanetz Bartley Agar durchgeführt. Das feine Erscheinungsbild der Kolonien nach 24 h bei 37°C bedingte, dass das Auszählen der Kolonien nach 48 und 72 h erfolgte.

Der *Brilliance*TM ESBL Agar erlaubt eine selektive Isolierung und präsumptive Identifikation der am meisten verbreiteten ESBL-bildenden Bakterien. Der Hersteller gibt für die Sensitivität des Agars 95% an während die Spezifität 94% beträgt. Die in unseren Versuchen mit *E. coli* 0010-73-1 (CTX-M 1), *E. coli* 003-13-2 (CTX-M 15 TEM) und *K. pneumoniae* SHV-18 (ATCC 700603) ermittelten Nachweisgrenzen waren 5 KbE/ml, 11 KbE/ml und 23 KbE/ml.

Wie für den *Brilliance*TM Salmonella Agar beschrieben, findet sich auch im Produktdatenblatt des *Brilliance*TM ESBL Agars der Hinweis, dass beim Direktausstrich von Stuhlproben eine unspezifische Verfärbung des Nährbodens auftreten kann, wenn fäkale Bestandteile mit den chromogenen Substanzen reagieren. Dieses führt zu keiner Beeinträchtigung des Nährbodens (OXOID 2003) und wurde bei der Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Die beiden eingesetzten *E. coli*-Isolate zeigten auf dem *Brilliance*TM ESBL Agar eine leicht unterschiedliche Blaufärbung, was ebenfalls von anderen Autoren beschrieben wurde (HUANG et al. 2010). Die Koloniefarbe von verschiedenen ESBL-bildenden *E. coli* variierte zwischen dem erwarteten blau bzw. blau-violett und pink (β -Galactosidase-negative *E. coli*) bzw. türkis-grün (HUANG et al. 2010). Letztere Koloniefarbe weist i.d.R. auf die sogenannte KESC-Gruppe (*Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Citrobacter*) hin. Dieses muss bei der Auswertung bedacht und eine weiterführende Speziesidentifizierung durchgeführt werden. Der durchschnittliche Gehalt an CTX-M-produzierenden *E. coli* liegt im Kot von Schweinen bei 10^6 bis 10^7 KbE/g (Ferkel), 10^3 bis 10^5 KbE/g (Absetzferkel) bzw. 0,0 bis 10^3 KbE/g (Mastschweine) (HANSEN et al. 2013). Einer aktuellen Studie nach waren Gärsubstrate mit 10^1 bis 10^4 ESBL-bildenden *E. coli*/g belastet (SCHAUSS et al. 2015). Diese Keimmengen können mit dem *Brilliance*TM ESBL Agar sicher detektiert werden. Letztere Studie (SCHAUSS et al. 2015) setzte ebenfalls einen chromogenen Nährboden für die Untersuchungen ein.

Zum Nachweis von *C. perfringens* wurde TSC Agar überschichtet mit eigelbfreier TSC Agar Basis und mCP-Agar ausgetestet. In der Trinkwasserverordnung 2001 wird für den Nachweis von *C. perfringens* einschließlich der Sporen mittels Membranfiltration der mCP Agar angegeben (ANON. 2013b). Die ermittelte Nachweisgrenze für den TSC Agar lag bei 11 KbE/ml und für den mCP Agar bei 2 KbE/ml. Der durchschnittliche physiologische Gehalt von *C. perfringens* im Kot von Rindern liegt bei $2,0 \times 10^2$ und im Kot von Schweinen bei $3,98 \times 10^3$ (GELDREICH 1978). Demzufolge erlauben beide Nährböden bei korrekter Handhabung einen sicheren Nachweis.

Bei der Überschichtung des TSC Agars war darauf zu achten, dass die Temperatur der Agarbasis soweit abgekühlt war, dass vegetative Bakterien nicht geschädigt wurden und ein Gießen ohne Verklumpen möglich war. Das Überschichten erfolgte unmittelbar nach dem Ausspateln, damit die Clostridien möglichst kurz einem höheren Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt waren. Bei der Verwendung von mCP Agar empfiehlt der Hersteller zur Bestätigung von *C. perfringens* eine Bedampfung des bewachsenen Nährbodens mit Ammoniumhydroxid für 20 bis 30 Sekunden. *C. perfringens* bildet saure Phosphatase, welche Phenolphthalein-Diphosphat spaltet, und für eine Verfärbung der Kolonie nach rosa oder rot sorgt. Kolonien anderer Clostridien, die ebenfalls opak-gelb wachsen, verfärben sich durch das Fehlen der sauren Phosphatase nicht. Trotz Verwendung der vom Hersteller

angegebenen Qualitätskontrolle (*C. perfringens* ATCC 13124) war kein eindeutiger und stabiler Farbumschlag nach der Bedampfung zu erzielen, der es erlaubt hätte, eine Auszählung der Kolonien vorzunehmen. Zudem erwies sich das Hantieren mit der geöffneten Agarplatte über der Ammonikflasche als nicht praktikabel. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung der Feldproben der TSC Agar ausgewählt. Bei Untersuchung der Gärreste und Gärsubstrate zeigte sich jedoch ein ähnliches Phänomen wie beim Enterococcus Selektivagar. Die zweite Auswertung nach 48 h war aufgrund einer intensiven Schwarzfärbung des gesamten Agars bei einigen Proben nicht mehr möglich. Dieses war bei der Austestung des Agars mit artifiziell beimpfter Matrix nicht aufgetreten. Darüber hinaus erwies sich das Erhitzen der Proben bei 65°C für 15 Minuten zur Unterdrückung der Begleitflora empfehlenswert. Dieser Vorgang begünstigt zusätzlich, dass Sporen zum Auskeimen angeregt werden, was sich positiv auf die Nachweisrate von *C. perfringens* auswirkte. Zusätzlich erbrachte die Untersuchung von in Flüssigmedium (TPYG) über mehrere Tage angereichertem Probenmaterial in den Proben, die in der bakteriologischen Untersuchung auf TSC Agar negativ waren, einen (molekularbiologischen) Nachweis von *C. perfringens*. Somit ist es für eine qualitative Aussage sinnvoll, bei der Untersuchung auf anaerobe Sporenbildner eine Anreicherung durchzuführen.

Eigelb Laktose Agar ist ein nicht selektiver Nährboden zur präsumtiven Identifizierung von Clostridien anhand der Laktoseverwertung sowie der Lecithinase- und Lipase-Aktivität. Er wird zum Nachweis von *C. botulinum* eingesetzt (MESSELHÄUSER et al. 2007; SCHNEIDER et al. 2013) und wurde für die Untersuchung der Biogasanlagen-Proben ausgewählt. Aufgrund der obligat anaeroben Wachstumseigenschaft von *C. botulinum* mussten alle Arbeitsschritte sehr zügig erfolgen, da eine anaerobe Arbeitsstation nicht zur Verfügung stand. Die Kultivierung des ausgewählten Typ B-Referenzstamms auf Eigelb Laktose Agar war erfolgreich, jedoch war es nicht möglich, eine Testkeimsuspension herzustellen, deren Keimgehalt ausreichend für die Beimpfung der Matrix und Validierung der Methode gewesen wäre. Auch ein mehrfaches Aufkochen der Nährbouillon zur Sauerstoffreduktion führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Zur Optimierung sollte hier ein nährstoffreicheres Flüssignährmediums wie z.B. TPYG-Bouillon eingesetzt und z.B. mit einer zweistufigen Anreicherung kombiniert werden (MESSELHÄUSER et al. 2007). Aus keiner der untersuchten Gärsubstrate und Gärreste gelang die Anzucht von *C. botulinum*. Verdächtige Kolonien konnten in den weiterführenden Untersuchungen nicht als *C. botulinum* bestätigt werden. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch die molekularbiologischen Untersuchungen der Proben-Anreicherungen in TPYG-Bouillon, die ebenfalls negativ getestet wurden.

Bei der Toxin-Gen Bestimmung der Feldisolate von *C. perfringens* erwies sich der Einsatz des PCR-Protokolls nach VAN ASTEN et al. (2009) als gut geeignet für eine Typisierung. Hingegen war dieses Protokoll für die Untersuchung von aufgereinigter DNA aus nativen Gärsubstraten

und Gärresten nicht zielführend, da die unspezifische Amplifikation von Nukleotidsequenzen eine Auswertung nicht möglich machte. Dieses konnte auch durch eine Touchdown-PCR nicht optimiert werden. Für den direkten Nachweis aus Gärresten und Gärsubstraten wäre die Entwicklung einer Toxintyp-spezifischen quantitativen real-time PCR empfehlenswert. Diese hätte jedoch den Nachteil, dass der Nachweis von DNA nicht mit dem Nachweis eines vermehrungsfähigen Bakteriums gleichzusetzen ist. Die Untersuchung von in Flüssigmedium (TPYG) angereichertem Probenmaterial ergab in den Proben, die in der bakteriologischen Untersuchung negativ waren, einen molekularbiologischen Nachweis von *C. perfringens*-Toxin-Genen. Die Anreicherung führt zum Auskeimen der Sporen und zur Anreicherung der Sporenbildner, so dass eine größere Menge an Ziel-DNA extrahiert werden kann. Dies wirkt sich positiv auf die Amplifikation spezifischer Gene und somit auf die Auswertbarkeit der konventionellen PCR aus.

Der molekularbiologische Nachweis von toxinbildenden *C. botulinum* nach dem Protokoll von HILL et al. (2010) zeigte bei den Referenzstämmen erwartungsgemäß das Vorhandensein des NTN-H-Gens. Mittels nachgeschalteter real-time PCR waren die jeweiligen *bont* der verschiedenen Toxintypen eindeutig nachzuweisen. In der aufgereinigten DNA aus den angereicherten Feldproben in TPYG-Bouillon wurde in keiner der eingesetzten Proben das NTN-H-Gen nachgewiesen. In der Originalpublikation ergab eine Stuhlprobe (200 mg) mit zehn Genkopien ein positivs PCR-Ergebnis (HILL et al. 2010). Das PCR-Verfahren ist demnach empfindlich genug, um *C. botulinum*-DNA aus der Anreicherung der Proben in TPYG-Bouillon nachzuweisen.

5.2 Bakteriologische Beurteilung der untersuchten Proben aus Biogasanlagen

Die anaerobe Lebendkeimzahl in den Proben aus den Vorgruben bzw. den Hydrolysestufen lag im Schnitt bei $2,0 \times 10^8$ KbE/g Probe. In den Fermentern betrug der durchschnittliche Gehalt $1,5 \times 10^7$ KbE/g und in den Nachgärern bzw. den Endlagern waren es 3,6 bzw. $4,8 \times 10^6$ KbE/g. In der Literatur sind Werte zwischen 10^6 und 10^7 KbE/ml beschrieben (STAFFA et al. 2003; BREVES 2012).

E. coli war in den hier untersuchten Proben aus den Vorgruben und Hydrolysestufen mit durchschnittlich $6,6 \times 10^5$ KbE/g enthalten, was sich mit den Angaben anderer Studien (10^5 bis 10^6 KbE/g) deckt (ADE-KAPPELMANN 2008; LEBUHN und WILDERER 2006; STAFFA 2003). Dieses entspricht ungefähr der durchschnittlichen Konzentration von Fäkalcoliformen im Kot von Rindern ($2,3 \times 10^5$) und Schweinen ($3,3 \times 10^6$) (GELDREICH, 1978). In den anderen beprobten Kompartimenten Fermenter, Nachgärer und Endlager, wurden $5,0 \times 10^3$ KbE/g, $6,3 \times 10^1$ KbE/g bzw. $1,7 \times 10^2$ KbE/g nachgewiesen und ist übereinstimmend mit den Angaben der anderen Autoren (ADE-KAPPELMANN 2008; LEBUHN und WILDERER 2006;

STAFFA 2003). Die Werte für die Coliformen entsprachen im Wesentlichen den ermittelten Werten für *E. coli*. Bezogen auf die Keimzahl in den Vorgruben bzw. Hydrolysestufen reduzierte sich die Anzahl an *E. coli* und coliformen Keimen im Biogasprozess um bis zu 4 log₁₀-Stufen, was mit den Angaben von BAGGE et al. (2005), WATCHARASUKRAN et al. (2009), LEBUHN und WILDERER (2006), BAGGE et al. (2010), WEILAND et al. (2007) und BREVES (2014) entspricht.

Auffällig war, dass aus allen Proben von PB 2 und PB 6, einer Nachgärerprobe aus PB 3 sowie einer Fermenterprobe von PB 8 weder *E. coli* noch coliforme Keime angezüchtet werden konnten. Im Falle des Nachgärers aus PB 3 ist dies dadurch zu erklären, dass der Nachgärer thermophil gefahren wird, und die durchschnittliche Temperatur bei 50 – 55°C liegt. *E. coli* und die meisten der coliformen Keime haben ihr Temperaturoptimum bei 37°C. Somit ist anzunehmen, dass sie bei 50 – 55°C im Nachgärer inaktiviert werden. Bei PB 6 handelt es sich um eine Biogasanlage, deren Gärsubstrat zu 43% aus Fischgülle besteht. Coliforme Bakterien kommen zwar in der Darmflora von Fischen vor, jedoch sind andere Spezies als *E. coli* vorherrschend (LARSEN et al. 2014). Von PB 8 wurden zwei Fermenterproben untersucht. In der ersten Probe war ein geringer Gehalt von 10¹ KbE/g *E. coli* bzw. coliforme Keime nachweisbar. Die Probe aus dem zweiten Fermenter war negativ. Die Ursache hierfür kann im zweistufigen Fermentationsprozess bei 40°C liegen, der zur Reduktion der Keimzahl führt. Der für die Untersuchung verwendete *Brilliance*TM *E. coli*/Coliform Selektiv Agar basiert auf dem Nachweis der Aktivität von β-D-Glucuronidase und β-Galactosidase. Ca. 94-96% der *E. coli* sind β-D-Glucuronidase-positiv. Es gibt jedoch Stämme (z.B. O157:H7) die keine β-D-Glucuronidase-Aktivität aufweisen (KILLIAN und BÜLOW 1976), weshalb sie nicht als *E. coli* identifiziert werden. Auch dieses wäre eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis von *E. coli*.

Zusammenfassend betrachtet entsprechen die in den Gärresten aus sächsischen Biogasanlagen ermittelten Keimzahlen den Normen für Fermentationsprodukte und Kompost der VO (EU) Nr. 142/2011 Anhang V Kapitel III Abschnitt 3, in welchen das Ergebnis einer Probe als zufriedenstellend gilt, wenn in allen Proben zu je 1 g die Keimzahl von 10³ nicht überschritten wird (ANON. 2011a).

Salmonellen wurden mit den hier verwendeten Kultivierungsverfahren in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen. In der vorgelegten Arbeit wurde auf eine Anreicherung der Proben bei der Untersuchung auf Salmonellen verzichtet, was im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen für den Nachweis von Salmonellen aus Gärsubstraten und Gärresten steht (KNIE et al. 2001; STAFFA 2003; DRČA 2007; ANON. 2007c; ADE-KAPPELMANN 2008; FRÖSCHLE und LEBUHN 2012; BAGGE et al. 2012; BREVES 2012). Bisher berichten zwei Studien über den Nachweis von Salmonellen (BREVES 2012; STAFFA 2003). In einem Bestand waren nach angeordneter Salmonellen-Impfung

Gülleproben sowie Proben aus den Fermentern und dem Endlager der angegliederten Biogasanlage positiv. Alle positiven Proben enthielten den Impfstamm, einige zusätzlich andere Serovare. Nachgewiesen wurden $1,5 \times 10^1$ bis $9,0 \times 10^2$ KbE/ml (STAFFA, 2003). In der zweiten Arbeit gelang der Nachweis in fünf von 105 Proben aus drei von 15 untersuchten Biogasanlagen nach dreifach bzw. vierfach fraktionierter Anreicherung (BREVES 2012). Bei vier der Proben handelte es sich um Gärsubstrate, in einem Fall konnte ein Nachweis aus Gärrest erfolgen. Eine Anreicherung begünstigt die Wiederbelebung von subletal geschädigten Salmonellen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Anreicherung der Proben in der vorliegenden Arbeit zu einem Salmonellen-Nachweis geführt hätte.

Durchschnittlich $1,2 \times 10^6$ KbE Enterokokken/g wurden im Untersuchungsmaterial der Vorgruben und Hydrolysestufen aus sächsischen Biogasanlagen festgestellt. Das entspricht in etwa der durchschnittlichen Enterokokken-Konzentration im Kot von Nutztieren (GELDREICH 1978). In der Vorgrubenprobe von PB 6 waren $2,0 \times 10^3$ KbE/g enthalten, während die Untersuchung der Proben aus dem Nachgärer und den Endlagern negativ ausfiel. Dieses hängt wahrscheinlich mit dem hohen Anteil an Fischgülle und dem geringen Anteil an Rinder- und Schweinegülle zusammen. Im Schnitt waren in den Fermentern $9,0 \times 10^4$ KbE/g und in den Nachgärern bzw. Endlagern $1,0 \times 10^3$ bzw. $9,0 \times 10^3$ KbE/g nachweisbar. Diese Werte sind übereinstimmend mit Daten aus der Literatur, die 10^5 bis 10^6 KbE/ml für Gärsubstrate und 10^2 bis 10^4 KbE/ml für die Gärreste angeben (LEBUHN und WILDERER 2006; BAGGE et al. 2005; STAFFA 2003).

Die Anzucht von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae*, die phänotypisch bestätigt werden konnten, gelang aus Proben von sechs (60%) der zehn untersuchten Biogasanlagen. In allen sechs Anlagen waren ESBL-bildende *E. coli* nachweisbar. In zwei Anlagen wurden darüber hinaus ESBL-bildende *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia fergussonii* und *Enterobacter aerogenes* isoliert. Die Anzucht gelang jeweils nur aus Proben der Vorgruben bzw. Hydrolysestufen sowie aus den Fermentern. Durchschnittlich waren in den Vorgruben bzw. Hydrolysestufen $3,5 \times 10^3$ KbE ESBL-bildende *Enterobacteriaceae*/g vorhanden, während in den Fermentern durchschnittlich $1,4 \times 10^1$ KbE/g nachweisbar waren. Aus Einzelproben wurden *E. coli* und *E. fergussonii* mit bis zu 10^4 KbE/g angezüchtet. Kotuntersuchungen von Schlachtschweinen (n=59) und Schlachtrindern (n=64) ergaben, dass 15,2% bzw. 17,1% ESBL-positiv waren. Der überwiegende Anteil waren ESBL-bildende *E. coli* (GESER et al. 2011). Eine zweite Studie zeigte, dass 15,3% der Schweine-, 13,7% der Rinder-, 8,6% der Schaf- sowie 63,4% der Hühnerproben hauptsächlich ESBL-bildende *E. coli* enthielten (GESER et al. 2012). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie sind demzufolge nicht überraschend und werden gestützt von einer Studie, die in Biogasanlagen-Proben überwiegend ESBL-bildende *E. coli* sowie *Enterobacter* spp., *Morganella* sp. und Bakterien der Gattungen *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bordetella*, *Achromobacter*, *Castellaniella* und *Ochrobactrum* nachweisen

konnte (SCHAUSS et al. 2015). 10^1 bis 10^4 ESBL-bildende *E. coli*/g Trockenmasse wurden mittels Direktausstrich in den Gärsubstraten nachgewiesen. In den Gärresten war, wie in der vorliegenden Arbeit, kein Nachweis im Direktausstrich möglich. Eine selektive Voranreicherung für ESBL-bildende *E. coli* konnte in >60% der zuvor negativ getesteten Gärreste ESBL-bildende *E. coli* nachweisen (SCHAUSS et al. 2015).

C. perfringens kommt ubiquitär im Erdboden vor und spielt durch die Fähigkeit der Proteolyse eine wichtige Rolle im Biogasprozess. Es ist davon auszugehen, dass *C. perfringens* nicht nur über die Gülle in den Biogasprozess gelangt. Auch in Biogasanlagen, deren Gärsubstrate ausschließlich aus nachwachsenden Rohstoffen bestehen, ist ein Vorkommen von *C. perfringens* beschrieben (BREVES 2012). Die Keimzahlen für *C. perfringens* lagen in der Vorgrube bzw. Hydrolyse im Durchschnitt bei $1,8 \times 10^5$ KbE/g und in den Fermenterproben bei $1,2 \times 10^5$ KbE/g. In den Proben aus den Nachgärern bzw. Endlagern konnten $1,8 \times 10^4$ bzw. $1,6 \times 10^4$ KbE/g nachgewiesen werden. Die physiologische Menge an *C. perfringens* im Kot von Nutztieren variiert von $\leq 10^3$ beim adulten Rind über 10^5 bis 10^6 beim Kalb und beträgt ca. 4×10^3 beim Schwein (KRÜGER 2010; GELDREICH 1978). In fast allen untersuchten Biogasanlagen blieb der Gehalt an *C. perfringens* über den gesamten Fermentationsprozess relativ konstant, was die Angaben anderer Autoren bestätigt (KNIE et al. 2001; BAGGE et al. 2005; LEBUHN und WILDERER 2006; BREVES 2012). Clostridien sind äußerst widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen und die Sporen von *C. perfringens* überstehen bis zu mehrere Stunden bei 100°C (SCHOOP 1980). In zwei Fällen (PB 3 und PB 8) konnten in der bakteriologischen Untersuchung keine *C. perfringens* angezüchtet werden, der Nachweis mittels PCR aus angereicherten Proben verlief jedoch positiv. Dieses kann durch die Schädigung von vegetativen *C. perfringens* durch längeres Einwirken von Sauerstoff bedingt gewesen sein. Denkbar ist auch, dass ein Fehler beim Übersichten des Nährbodens (Agar zu heiß, Wartezeit zu lange) zu keinem Wachstum auf TSC Agar geführt hat.

Die 22 *C. perfringens* Feldisolate wurden alle dem Typ A zugeordnet; sechs Isolate besaßen zudem das β_2 -Toxin-Gen. Bei der molekularbiologischen Untersuchung der in TPYG-Bouillon angereicherten Proben waren in allen Proben *C. perfringens* Toxin-Gene nachweisbar, auch in jenen Proben, die in der bakteriologischen Untersuchung negativ waren. Die Anreicherung der Proben begünstigt die Wiederbelebung von subletal geschädigten vegetativen Formen und führt zu einem Auskeimen der Sporen. Bis auf eine Ausnahme wurde in allen untersuchten Anreicherungen *C. perfringens* Typ A nachgewiesen. Zudem waren alle *C. perfringens* Typ A positiv für das β_2 -Toxin-Gen. BREVES (2012) kommt zu einem vergleichbaren Ergebnis. *C. perfringens* Typ A ist der häufigste bei Tieren vorkommende Toxin-Typ (BISPING und AMTSBERG 1988). Bei zwei Proben konnte nicht definitiv bestimmt werden, ob nur das β_2 -Toxin-Gen (548 bp) oder zusätzlich das Entertoxin-Gen (485 bp)

vorhanden war. In einem Fall konnte *C. perfringens* Typ C identifiziert werden. Dieser kommt auch im Magen-Darm-Trakt von Säugetieren vor, wenn auch weniger häufig als der Typ A (QUINN et al. 2011).

Für toxinbildende *C. botulinum* gelang in der vorliegenden Arbeit weder mit bakteriologischen noch mit molekularbiologischen Verfahren ein Nachweis. Dieses entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten (WEILAND 2007; BAGGE et al. 2010; BREVES 2012; BREVES 2014). In einer Untersuchung von 1.420 Rinderkotproben aus 142 Betrieben im Rahmen des Projektes „Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischen Krankheitsgeschehen“ der Tierärztlichen Hochschule Hannover (2014) konnte das FLI in zwei Proben ohne Voranreicherung und in 31 Proben nach der Voranreicherung BoNT-Gene mittels PCR nachweisen (FLI 2014a). Dieses entspricht 2,2% der Einzeltierproben. Somit ist das Risiko eines Eintrages von toxinbildenden *C. botulinum* durch die Verwendung von Rindergülle als Substrat für die Biogasproduktion als gering anzusehen. Zudem kommt *C. botulinum* ubiquitär im Boden vor so dass auch durch zu tiefes Abmähen kontaminierte Silage als Ursache für das Vorkommen von *C. botulinum* in Gärsubstraten anzunehmen wäre (BISPING und AMTSBERG 1988; QUINN et al. 2011).

Zusammenfassend betrachtet, kommt die vorliegende Arbeit zu dem Ergebnis, dass der Keimgehalt von Gärsubstraten und Gärresten nach dem mesophilen Biogasprozess im Wesentlichen dem Gehalt der Gärsubstrate, die überwiegend aus Nutztier-Gülle bestehen, entsprach. Dieses bestätigt die Aussage anderer Studien, die besagt, dass die Keimflora eines Gärrestes von der Keimflora des Gärsubstrates abhängig ist (BAGGE et al. 2005; LEBUHN und WILDERER 2006; BAGGE et al. 2010; BREVES 2012). Je geringer die Belastung des Substrates, desto geringer die Keimbelastung des Gärrestes nach dem mesophilen Biogasprozess (BREVES 2012; LEBUHN und FRÖSCHLE 2012). Somit spielt die gute fachliche Praxis der landwirtschaftlichen Betriebe, die Gärsubstrate in Form von Gülle oder nachwachsenden Rohstoffen produzieren, eine wichtige Rolle in Bezug auf die Keimbelastung der Gärreste.

6 Zusammenfassung

Janina Marta Lucia Pospiech

Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen des Freistaates Sachsen: Auswahl und Etablierung von bakteriologischen und molekularbiologischen Verfahren zum Nachweis ausgewählter Indikatorkeime

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht Juni 2015

100 Seiten, 23 Tabellen, 66 Abbildungen, 111 Literaturstellen, Anhang

Schlüsselwörter: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, ESBL-bildende *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, Biogasanlage

Die im Biogasprozess anfallenden Gärreste werden oftmals als Wirtschaftsdünger verwendet. Krankheitserreger, die sich in den Gärresten befinden können über die Düngung in die Lebensmittelkette gelangen. Die Möglichkeit einer Vermehrung von Bakterien in den Biogasanlagen sowie deren Ausbreitung schürt die Bedenken der Öffentlichkeit. Das Ziel dieser Arbeit war es, Nachweismethoden für die Untersuchung von Proben aus Biogasanlagen zu etablieren, die Praxistauglichkeit dieser anhand von Proben aus Biogasanlagen zu überprüfen und die mikrobielle Belastung dieser Proben hinsichtlich ausgewählter Indikatorkeime zu erfassen. Bei den Indikatorkeimen handelte es sich um *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, Enterokokken, *Escherichia coli*, ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* und Salmonellen.

Für die Etablierung der bakteriologischen Nachweismethoden wurde autoklavierter Gärrest mit einer definierten Keimmenge beimpft und auf verschiedene Nährmedien aufgebracht. Diese wurden bebrütet, ausgezählt und die KbE/ml berechnet. Mittels Probitanalyse wurde für jedes Medium die untere Grenze für den Nachweis aus beimpftem Gärrest bestimmt. Bei den Nährmedien handelte es sich um *Brilliance*™ *Salmonella* Agar, XLT4 Agar und XLD Agar für den Nachweis von *Salmonella* spp. Für *E. coli* wurden Tergitol 7 Lactose TCC Agar und *Brilliance*™ *E. coli*/Coliform Selektiv Agar verwendet. Der Nachweis von Enterokokken erfolgte mittels Slanetz Bartley Agar und *Enterococcus* Selektivagar. Für die ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* wurde der *Brilliance*™ ESBL Agar eingesetzt. Die getesteten Nährmedien zum Nachweis von *C. perfringens* waren Membran *Clostridium Perfringens* (mCP) Selektivnährboden sowie Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar überschichtet mit TSC Agarbasis. Für *C. botulinum* erfolgte der Nachweis auf Eigelb Laktose Agar. Darüber hinaus wurde eine PCR zur *C. perfringens* Toxintyp-Bestimmung nach dem Protokoll von VAN ASTEN

et al. (2009) etabliert. Zum Nachweis von *C. botulinum* wurde die PCR nach dem Protokoll von HILL et al. (2010) eingesetzt. Bei der Untersuchung der Praxistauglichkeit wurden Proben aus zehn Biogasanlagen des Freistaates Sachsen entnommen und untersucht. Hierbei handelte es sich um Proben aus Abschnitten vor, während und nach der Fermentation. Anhand der ermittelten Nachweisgrenze sowie der Handhabung wurden die folgenden Nährmedien für die Untersuchung der Biogasanlagen-Proben ausgewählt: *Brilliance*™ Salmonella Agar, XLT4 Agar, *Brilliance*™ E. coli/Coliform Selektiv Agar, Slanetz Bartley Agar, *Brilliance*™ ESBL Agar, TSC Agar überschichtet mit TSC Agarbasis und Eigelb Laktose Agar. Für die Anzucht anaerober Bakterien wurden die Proben vor der Beimpfung der Agarplatten erhitzt. Zudem erfolgte eine Anreicherung des zuvor erhitzten Probenmaterials in TPYG Bouillon. Diese wurde genutzt, um daraus aufgereinigte DNA mittels PCR auf *C. botulinum* und *C. perfringens* zu untersuchen. Die verwendeten Nährmedien wurden im Praxistest positiv evaluiert. Die Ergebnisse für die Proben aus den Biogasanlagen zeigten, dass, mit Ausnahme von *C. perfringens*, alle Indikatororganismen während des Biogasprozesses einer Reduktion unterlagen. Die durchschnittliche anaerobe Lebendkeimzahl belief sich auf 10^7 bis 10^8 KbE/g Probe. *E. coli* erfuhr eine Reduktion um bis zu vier Zehnerpotenzen. Enterokokken wurden um 1 bis 2 \log_{10} Stufen reduziert. ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* konnten in sechs der zehn Biogasanlagen nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich überwiegend um *E. coli* und *Klebsiella* spp. In keiner der Proben konnten Salmonellen oder *C. botulinum* nachgewiesen werden. Typ A war der am häufigsten nachgewiesene *C. perfringens*-Toxintyp. Das β_2 -Toxin-Gen wurde in 20 Fällen nachgewiesen. Einmal konnte *C. perfringens* Typ C, β_2 -Toxin-Gen-positiv detektiert werden.

Der hygienische Status der Gärreste entsprach in etwa dem hygienischen Status von Gülle. In Abhängigkeit vom Indikatorkeim war eine Verbesserung des Status durch eine Reduktion der Keimzahl festzustellen.

7 Summary

Janina Marta Lucia Pospiech

Investigation of input and output samples from Saxon biogas plants: detection of selected target bacteria using bacteriological and molecularbiological methods

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health

Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2015

100 pages, 23 tables, 66 figures, 111 references, appendix

Keywords: *E. coli*, enterococci, ESBL-producing Enterobacteriaceae, *Salmonella* spp., *C. perfringens*, *C. botulinum*, biogas plant

The risk of an outbreak due to the multiplication of bacteria during the biogas process, in particular *C. botulinum*, is controversially discussed. As the digested residues of the biogas process are often used as soil fertilizers, resisting pathogens could likely be dispersed and introduced into the food chain. In general, target or indicator organisms are used to evaluate the hygienic status of biogas plant residues. The objective of this study was to establish methods for the detection and quantification of selected bacterial organisms and to verify their practical suitability using samples from biogas plants.

The target bacteria selected were *E. coli*, enterococci, ESBL-producing Enterobacteriaceae, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum*. In order to choose appropriate media, the limit of detection (LOD) for several different agars was determined using a logistic regression model (probit analysis). Sterilised biogas waste as a matrix surrogate was artificially infected with the respective bacteria, serially diluted and plated onto the media. Colony-forming units (cfu) were counted and the LOD calculated. The tested media were: Tergitol 7 Lactose TCC agar, Brilliance™ *E. coli*/Coliform selective agar (*E. coli* and coliform bacteria), Brilliance™ *Salmonella* agar, XLT4 agar, XLD agar (*Salmonella* spp.), Brilliance™ ESBL agar (ESBL-producing Enterobacteriaceae), Slanetz Bartley agar, Enterococcus selective agar (enterococci), Membran *Clostridium Perfringens* (mCP) selective agar, Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) agar covered with TSC agar base (*C. perfringens*), and egg-yolk lactose agar (*C. botulinum*).

The media selected for the investigation of biogas plant samples were: Brilliance™ *E. coli*/Coliform selective agar, Brilliance™ *Salmonella* agar, XLT4 agar, Brilliance™ ESBL agar, Slanetz Bartley agar, TSC agar covered with TSC agar basis and egg-yolk lactose agar.

For the verification of the practical suitability, samples were taken from ten Saxon biogas plants. The samples were taken before, during and after digestion. To cultivate clostridia, the samples were heated before plating onto the media and were enriched in TPYG bouillon, additionally. Extracted DNA from these enrichments was used to detect *C. perfringens* and *C. botulinum* via PCR. PCR was also applied for toxin typing of *C. perfringens* isolates.

The media chosen proved to be suitable for the detection and quantification of the target bacteria in samples from biogas plants taken before, during and after digestion. However, colonies with *Salmonella*-like appearance grown on Brilliance™ *Salmonella* agar turned out to be other Enterobacteriaceae hence, this agar should be used by an experienced microbiologist. The average amount of aerobic bacteria found in biogas plant samples was 107 to 108 cfu/g. Comparison of bacterial numbers in samples taken before, during and after digestion revealed a reduction of all target bacteria, with the exception of *C. perfringens*. *E. coli* was reduced up to 4 log₁₀-steps, while the reduction of enterococci was 1 log₁₀-step. ESBL-producing Enterobacteriaceae were detected in six out of ten biogas plants. Mostly, *E. coli* and *Klebsiella* spp. were isolated. *Salmonella* spp. and *C. botulinum* were not detected in any sample with the methods (culture and PCR) applied. *C. perfringens* toxin type A was predominantly found, followed by the β 2-toxin type. *C. perfringens* type C also harbouring the β 2 toxin-gene was detected once. These results are in accordance to other studies published elsewhere.

The results of the bacteriological investigations revealed, that the hygienic status of waste from biogas plants is comparable to the hygienic conditions of liquid manure. Depending on the target bacteria, an even lesser amount was found in output samples from Saxon biogas plants.

8 Literaturverzeichnis

Ade-Kappelmann K. Untersuchungen zur seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Gärresten aus Bioabfällen nach der Behandlung in Anaerobanlagen [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2008.

Agudelo Higuera NI, Huycke MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, Hrsg. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. 1. Aufl. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014 [zitiert vom 29.09.2014] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>>.

Aitken MD, Sobsey MD, Blauth KE, Shehee M, Crunk PL, Walters GW. Inactivation of *Ascaris suum* and Poliovirus in Biosolids under Thermophilic Anaerobic Digestion Conditions. Environ Sci Technol. 2005;39(15):5804–9.

Ammon A, Bräunig J. Lebensmittelbedingte Erkrankungen in Deutschland. Berlin: Robert-Koch-Institut; 2002. (Gesundheitsberichterstattung des BundesH. 2002,01).

Anon. Verordnung zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder (Rinder-Salmonellose-Verordnung - RindSalmV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. November 1991 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 2118), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 17. April 2014 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 388) geändert worden ist. (1991).

Anon. Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Enterokokken - Teil 2: Verfahren durch Membranfiltration (DIN EN ISO 7899-2:2000-11). Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2000.

Anon. Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien - Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für Wässer mit niedriger Begleitflora (DIN EN ISO 9308-1:2001-07). Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2001.

Anon. Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte). Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 273 vom 10. Oktober 2002 S. 0001 - 0095. (2002).

Anon. Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG) vom 25. Januar 2004 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 82), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 91 des Gesetzes vom 22. Dezember 2011 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 3044) geändert worden ist. (2004a).

Anon. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zu Zählung von *Clostridium perfringens* - Koloniezählverfahren (DIN EN ISO 7937:2004-11). Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2004b.

Anon. Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes (Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung - TierNebV) vom 27. Juli 2006 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 1735), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 23. April 2012 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 611) geändert worden ist. (2006).

Anon. Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 27. Februar 2007 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 221), die zuletzt durch Artikel 5 Absatz 36 des Gesetzes vom 24. Februar 2012 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 212) geändert worden ist. (2007a).

Anon. CEN BT/TF 151 – WP 3-Part I, Annex H - Methoden zur Validierung von biotechnologischen, thermischen und chemischen Behandlungsprozessen für tierische Nebenprodukte, Klärschlamm und Bioabfall zur Gewährleistung der hygienischen Unbedenklichkeit der hergestellten Dünger oder vergleichbarer Produkte mittels Exposition von Prüforganismen oder Prüfviren - Teil 1 : Validierung mit vegetativen Bakterien: Project Horizontal; 2007b [zitiert vom 30.08.2013], <https://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/D3.4_Validation-Parasites_HYG_2008.pdf>.

Anon. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. (DIN EN ISO 6579:2002+A1:2007-10). Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2007c.

Anon. Düngegesetz (DüngG) vom 9. Januar 2009 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 54, 136), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 15. März 2012 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 481) geändert worden ist. (2009a).

Anon. Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte)) Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 300, S.1 vom 14.11.2009. (2009b).

Anon. Verordnung (EU) Nr. 142/2011 der Kommission vom 25. Februar 2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren). Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 54, S.1 vom 26.2.2011. (2011a).

Anon. Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (TKrMeldpflV 1983) in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 252), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 12. Juni 2013 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 1576) geändert worden ist. (2011b).

Anon. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen) in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 1404), die durch Artikel 1 der Verordnung vom 12. Juni 2013 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 1576) geändert worden ist. (2011c).

Anon. Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Düngemittelverordnung - DüMV) vom 05. Dezember 2012. Bundesgesetzblatt Teil I S. 2482. (2012).

Anon. Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden Bioabfallverordnung (Bioabfallverordnung - BioAbfV) vom 4. April 2013. Bundesgesetzblatt Teil I S. 658. (2013a).

Anon. Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001) in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. August 2013 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 2977), die durch Artikel 4 Absatz 22 des Gesetzes vom 7. August 2013 (Bundesgesetzblatt Teil I S. 3154) geändert worden ist. (2013b).

Anon. Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn und bei Puten (Geflügel-Salmonellen-Verordnung - GfLSalmoV) vom 17. Januar 2014. Bundesgesetzblatt Teil I S. 58. (2014a).

Anon. Wasserbeschaffenheit - Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien - Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für Wässer mit niedriger Begleitflora (DIN EN ISO 9308-1:2014-12). Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2014b.

Bagge E, Persson M, Johansson K. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. J Appl Microbiol. 2010;(109):1549–65.

Bagge E, Sahlström L, Albiñ A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. Water Res. 2005;39(20):4879–86.

Bisping W, Amtsberg G, Hrsg. Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals. Berlin: P. Parey Scientific Publishers; 1988.

Bisson JW, Cabelli VJ. Membrane filter enumeration method for Clostridium perfringens. Appl Environ Microbiol. 1979;37(1):55–66.

Böhnel H, Schwagerick B, Gessler F. Visceral botulism - a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2001;48(6):373–83.

Bonadonna L, Cataldo C, Semproni M. Comparison of methods and confirmation tests for the recovery *Escherichia coli* in water. *Desalination*. 2007; 213(1-3):18–23.

Breves G. Abschlussbericht zu Einschätzung des Risikopotentials der Biogastechnologie in mikrobiologischer Hinsicht: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; 2012.

Breves G. Teil 2: Mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärs substrat (Physio). In: Tierärztliche Hochschule Hannover, Hrsg. Abschlussbericht: Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen und Teilprojekt: Mikrobiologisches Risikopotential von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärs substrat; Forschungsprojekt-Nummer: 2810HS005; 2014. p. 104–113 .

Büchter B. Vorkommen und Charakterisierung von Extended-Spectrum-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierenden *Escherichia coli* bei Lebensmittel liefernden Tieren [Dissertation med. vet.]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2010.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2012. Tenazität (Widerstandsfähigkeit) von Noroviren in Erdbeerkompott (Stellungnahme Nr. 038/2012 des BfR vom 6. Oktober 2012), [zitiert vom 18.09.2014] <<http://www.bfr.bund.de/cm/343/tenazitaet-widerstandsfaehigkeit-von-noroviren-in-erdbeerkompott.pdf>>.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2013. Berlin: BfR Wissenschaft; Dezember 2015 [zitiert vom 23.04.2015], <<http://www.bfr.bund.de/cm/350/erreger-von-zoonosen-in-deutschland-im-jahr-2013.pdf>>.

Burkwall MK, Hartman PA. Comparison of Direct Plating Media for the Isolation and Enumeration of Enterococci in Certain Frozen Foods. *Appl Microbiol*, 1964;12:18–23.

Carter GR, Wise DJ, Hrsg. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 6. Aufl. Ames, Iowa: Iowa State Press; 2004.

Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Richardson AC. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *Salmonellae*. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(2):807–12.

Daschner F, Dettenkofer M, Frank U, Scherrer M. Praktische Krankenhaushygiene und Umweltschutz (Mit 123 Tabellen. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2006, [zitiert vom 11.03.2014] <<http://www.myilibrary.com?id=62366>>.

Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect*. 2002 4(10):1059–66.

Drča M. Seuchenhygienische-mikrobiologische Untersuchungen an einer mesophil betriebenen Biogasanlage zur Verwertung von Speiseresten in Verbindung mit methodischen Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und Escherichia coli aus biologischem Material [Dissertation med. vet]. Leipzig, Hohenheim: Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät; Universität Hohenheim; 2007.

El Sukhon SN. Vorkommen und Bedeutung von Clostridium perfringens beim Schwein in Nordwestdeutschland [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo Hannover; 1974.

Eller C, Simon S, Miller T, Frick J, Prager R, Rabsch W et al. Presence of β -lactamases in extended-spectrum-cephalosporin-resistant Salmonella enterica of 30 different serovars in Germany 2005-11. J Antimicrob Chemother. 2013;68(9):1978–81.

Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clin Microbiol Infect. 2012;18(7):646–55.

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) 2010. Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung. 5. Aufl. Gülzow. p. 22.

Fachverband Biogas e. V. 2014. Hygienepapier (Verhalten von Krankheitserregern in Biogasanlagen. Freising; [zitiert vom 29. Sep. 2014].

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) 2014a. Bedeutung von Clostridium botulinum bei chronischen Krankheitsgeschehen Schlussbericht Friedrich-Loeffler-Institut 2014; Teilprojekt "Clostridiendiagnostik". Jena: Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen.

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) 2014b. Tiergesundheitsjahresbericht 2012. Greifswald-Insel Riems; 13.03.2014 [zitiert vom 14.03.2014].

Friehe J, Weiland A, Schattauer A. Grundlagen der anaeroben Fermentation: Entstehung von Biogas. In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Hrsg. Leitfaden Biogas: Von der Gewinnung zur Nutzung. 5. Aufl. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe; 2010. p. 21–22, <nachwachsende-rohstoffe.de>.

Friese A, Rösler U. ESBL- und AmpC-produzierende Enterobakterien bei Tieren. Krankenh. hyg. up2date 2013; 08(01):49–63.

Fröschle B, Lebuhn M. Abtötung von Salmonellen im Biogasprozess; August 2012 [zitiert vom 24.04.2015],
<http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/informationen/p_44803.pdf>.

Geldreich EE. Bacterial Populations and Indicator Concepts in Feces, Sewage, Stormwater and Solid Wastes. In: Berg G, Hrsg. Indicators of viruses in water and food. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science Publishers Inc.; 1978. p. 51–97 .

Gerowitt B, Westerman PR. Unkrautsamen in der Biogas-Prozesskette. In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL), Hrsg. Untersuchungen zum phytosanitären Risiko bei der anaeroben Vergärung von pflanzlichen Biomassen in Biogasanlagen; 2012. p. 30–6 (KTBL-Sonderveröffentlichung).

Geser N, Stephan R, Korczak BM, Beutin L, Hachler H. Molecular Identification of Extended-Spectrum-beta -Lactamase Genes from Enterobacteriaceae Isolated from Healthy Human Carriers in Switzerland. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(3):1609–12.

Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cernela N et al. Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland. J Food Prot. 2011;74(3):446–9.

Gornik V. Cryptosporidiosis. Bundesgesundhbl. 1997; 40(12):475–84.

Gutzmann F, Layton H, Simkins K, Jarolmen H. Influence of antibiotic-supplemented feed on occurrence and persistence of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected swine. Am J Vet Res. 1976;37(6):649–55.

Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, Hrsg. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3. Aufl. Ames, Iowa: Blackwell Pub.; 2004. p. 193–224.

Hansen KH, Damborg P, Andreasen M, Nielsen SS, Guardabassi L. Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. Appl Environ Microbiol. 2013;79(3):794–8.

heipha. Enterokokken - Agar nach Slanetz und Bartley. 2010 [zitiert vom 20.04.2015], <http://www.heipha.de/files/product/de/2192e-2-0506_Enterokokken-Slanetz-Bartley.pdf>.

Hill BJ, Skerry JC, Smith TJ, Arnon SS, Douek DC. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. BMC Microbiol. 2010;10(1):267.

Hoferer M. Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft. [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2001.

Hofmann M, Schultheiß U. Phytohygienische Aspekte in der Biogaskette. Darmstadt; 2013. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL) Fachartikel.

Hoy S. Anfall und hygienisch-ökologische Eigenschaften von organischen Düngern. In: Methling W, Unshelm J, Hrsg. Umwelt- und tiergerechte Haltung von Nutz-, Heim- und Begleittieren: Mit 240 Tabellen. Berlin: Parey; 2002. p. 101.

Huang T, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynski Y. Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta- lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2010;48(6):2091–6.

Juris P, Tóth F, Lauková A, Plachý P, Dubinský P, Sokol J. Survival of model bacterial strains and helminth eggs in the course of mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. Vet Med (Praha) 1996;41(5):149–53.

Kato S, Fogarty E, Bowman D. Effect of aerobic and anaerobic digestion on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Ascaris suum* eggs. Int J Environ Health Res 2003;13(2):169–79.

Kilian M, Bülow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol Microbiol Scand B 1976;84(5):245–51.

Knie A, Haumacher R, Philipp W, Martens W, Böhm R. Forschungsbericht FZKA-BWPLUS (Untersuchungen zur Phytohygiene in Anaerobanlagen (Halb- bzw. großtechnische Anlagen); Universität Hohenheim: Institut für Tierhygiene; 2001.

Krüger M. Aktuelle Erkrankungen im Milchviehbetrieb: Diagnostik und Bedeutung von Clostridienerkrankungen bei Rindern. 9. Agrar- und Veterinär-Akademie (AVA)-Haupttagung 17. - 21.03.2010, Göttingen.

Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL), Hrsg. Faustzahlen Biogas 3. Ausgabe. Tabellenwerk. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft. 2013.

Lang A. Mikrobiologische Untersuchungen über die Eignung verschiedener Indikatororganismen zur seuchenhygienischen Beurteilung von Klärschlamm [Dissertation agr.] Hohenheim: Universität Hohenheim; 1987.

Larsen AM, Mohammed HH, Arias CR. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. J Appl Microbiol. 2014;116(6):1396–404.

Lebuhn M, Fröschle B. Hygienische Aspekte beim Einsatz von Gärresten. In: Düngung mit Biogasgärresten effektiv-umweltfreundlich-bodenschonend; 2012. p. 59–71 .

Lebuhn M, Wilderer P. Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen. In: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Hrsg. Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten. 1. Aufl. Freising; 2006 (Schriftenreihe).

Leistner R, Sakellariou C, Gürntke S, Kola A, Steinmetz I, Kohler C et al. Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* from bloodstream infection. *Infect Drug Resist.* 2014;7:57–62.

Libby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles CL. *Salmonella*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, Hrsg. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3. Aufl. Ames, Iowa: Blackwell Pub.; 2004. p. 143–67 .

Literak I, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, Aarestrup F et al. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J Appl Microbiol.* 2009;108(5):1702–11.

Maurer M, Winkler J. Biogas - Theoretische Grundlagen, Bau und Betrieb von Anlagen. Karlsruhe: Verlag C.F. Müller; 1980.

Messelhäuser U, Zucker R, Ziegler H, Elmer-Englhard D, Kleih W, Höller C et al. Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ A, B, E und F mittels real-time-PCR. *J Verbr Lebensm.* 2007;2(2):198–201.

Miller RG, Tate CR, Mallinson ET, Scherrer JA. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. *Poult Sci.* 1991;70(12):2429–32.

Monteith HD, Shannon EE, Derbyshire JB. The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. *J Hyg (Lond)* 1986;(97(1)):175–84.

Oechsner H, Lemmer A. Was kann die Hydrolyse bei der Biogasvergärung leisten? In: Biogas 2009: Energieträger der Zukunft ; Tagung Stuttgart, 24. und 25. Juni 2009. Düsseldorf: VDI-Verl.; 2009. p. 37–46 (VDI-Berichte; vol. 2057).

OXOID GmbH. OXOID Handbuch. 6. aktualisierte deutsche Ausgabe. Wesel; 2003.

OXOID. Brilliance™ *Salmonella* (Folio No 1269/MS/11/10); 2010a [zitiert vom 07.04.2015], <http://www.oxid.com/pdf/27360_Brilliance_Salm_food.pdf>.

OXOID. *Salmonella* Precis (Folio No 1215/MS/11/10); 2010b [zitiert vom 07.04.2015], <http://www.oxid.com/pdf/uk/27362_Salmonella_Precis.pdf>.

Pfeifer Y, Eller C. Aktuelle Daten und Trends zur β -Lactam-Resistenz bei gramnegativen Infektionserregern. Bundesgesundheitsbl. 2012; 55(11-12):1405–9.

Plachy P, Placha I, Juris P. Effect of anaerobic stabilization of sewage sludges on the survival of *Ascaris suum* under laboratory conditions. Helminthologia 1997;(34):229–34.

Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, Hrsg. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe; 2000.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ESFS, Hartigan PJ, Hrsg. Veterinary microbiology and microbial disease. 2. Aufl. Chichester: Wiley-Blackwell; 2011.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2014. [zitiert vom 24.03.2014] <<http://www.R-project.org/>>.

Reinhold G, Jahn O. Hygienisierende Wirkungen der Biogaserzeugung auf die Gärsubstrate. In: Generalthema "Qualitätssicherung in landwirtschaftlichen Produktionssystemen": Kongressband 2004 Rostock ; 116. VDLUFA-Kongress. Speyer: VDLUFA-Verl.; 2004. p. 256–62 (Schriftenreihe; 60/2005).

Robert Koch-Institut (RKI) 2004. Epidemiologisches Bulletin (Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health). Berlin; 10. Dezember 2004/Nr. 50. [zitiert vom 18.09.2013] <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2004/Ausgabenlinks/50_04.pdf?__blob=publicationFile>.

Robert Koch-Institut (RKI) 2013. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2012. Berlin, [zitiert vom 14.03.2014] <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2012.pdf?__blob=publicationFile>.

Rolle M, Mayr A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Aufl. Stuttgart: Enke; 2007.

Rückert V. Mikrobiologische Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Flüssigmistbehandlung [Dissertation agr.]: Universität Hohenheim; 1991.

Schauss T, Glaeser SP, Gütschow A, Dott W, Kämpfer P. Improved Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* in Input and Output Samples of German Biogas Plants by a Selective Pre-Enrichment Procedure. PLoS ONE 2015;10(3):e0119791.

Schneider. Entwicklung und Etablierung verschiedener Nachweisverfahren für *Clostridium botulinum* und aktiver Toxinnachweis mit ELISA-Verfahren in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes sowie Untersuchungen zur Stabilität der Toxine [Dissertation rer. net.]. Berlin: Freie Universität Berlin. 2013.

Schnieder T. Helminthosen des Schweines. In: Rommel LM, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T, Hrsg. Veterinärmedizinische Parasitologie: Mit 100 Tabellen. 5. Aufl. Berlin: Parey; 2000 .

Schoop G. Clostridien der Haustiere. In: Blobel H, Schließer TH, Hrsg. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Stuttgart - New York: Gustav-Fischer-Verlag; 1980 .

Schubert, R. Bioindikation in terrestrischen Ökosystemen. Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag; 1985.

Seigner L, Freidrich R, Kaemmerer D, Büttner P, Poschenrieder G. Hygienisierungspotential des Biogasprozesses (Ergebnisse aus einem Forschungsprojekt); Freising-Weihenstephan: Institut für Pflanzenschutz; August 2012. Schriftenreihe.

Sonnenschein. *Clostridium botulinum*. In: Blobel H, Schließer TH, Hrsg. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Stuttgart - New York: Gustav-Fischer-Verlag; 1980 .

Stadlbauer EA. Methanbildung durch anaerobe Fermentation. In: Stadlbauer EA, Sixt H, Konstadt HG, Franzius V, Gosch A, Haferkamp H, Hees N, Ladenburger E, Rüprich W, Seufert H, Hrsg. Biogasanlagen. Grafenau /Württ: Expert Verlag; 1982 (Kontakt und Studium; Bd. 103). p. 17–47.

Staffa W. *Salmonella Typhimurium* DT104 aus einer mesophilen Biogasanlage: Überlebenszeiten und experimentelle Inaktivierung durch ausgewählte organische Säuren [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Universität Leipzig; 2003.

van Asten AJ, van der Wiel CW, Nikolaou G, Houwers DJ, Gröne A. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol.* 2009;136(3-4):411–2.

Venables WN, Ripley BD. Modern applied statistics with S. 4. Aufl. New York: Springer; 2002. (Statistics and computing).

Wandrey C, Aivasidis A. Zur Reaktionskinetik der anaeroben Fermentation. *Chem Ing Tech.* 1983; 55(7):516–24.

Watcharasukarn M, Kaparaju P, Steyer J, Krogfelt KA, Angelidaki I. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants. *Microb Ecol.* 2009;58(2):221–30.

Weiland P. Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Vorkommen von Clostridium botulinum in Substraten und Gärrückständen von Biogasanlagen (Abschlussbericht); Projektförderung durch das Niedersächsische Ministerium für den ländlichen Raum, Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Braunschweig: Institut für Technologie und Biosystemtechnik, Institut für Agrarökologie; Juni 2007.

Whitlock. Neurotoxogenic Clostridia. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, Hrsg. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3. Aufl. Ames, Iowa: Blackwell Pub.; 2004 .

9 Anhang

9.1 Aufbereitung der Proben für die PCR

9.1.1 Aufbereitung der Proben für die Etablierung und Standardisierung

Die Aufreinigung der DNA für die Etablierung und Standardisierung der PCR-Verfahren erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Kit der Firma Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers. Im weiteren Text werden folgende Begriffe verwendet:

- AL Puffer: Lysis Puffer
- AW1 Puffer: Waschpuffer 1
- AW2 Puffer: Waschpuffer 2
- AE Puffer: Elutionspuffer

Die Zentrifugationsschritte wurden in einer Heraeus Fresco 17 Centrifuge (Rotor # 75003424) durchgeführt.

Aufreinigungsprotokoll

- In der Sicherheitswerkbank wurden 180 µl der PBS-Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert.
- 200 µl Al-Puffer und 20 µl Proteinase K wurden hinzugegeben; anschließend wurde auf dem Vortex-Mixer gemischt
- Das Gemisch wurde für 60 Minuten bei 56°C inkubiert.
- Im Anschluss wurden 200 µl Ethanol absolut für die Molekularbiologie hinzu pipettiert und die Reaktionspartner gemischt.
- Das komplette Gemisch wurde auf eine Säule pipettiert.
- Bei 6 000 x g und Raumtemperatur wurde 1 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- 500 µl AW1- Puffer wurden nun auf die Säule gegeben.
- Bei 6 000 x g und Raumtemperatur wurde erneut 1 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Im nächsten Schritt wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule gegeben.
- Bei 17 000 x g und Raumtemperatur wurde 3 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Anschließend wurde bei 17 000 x g und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert.

- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Abschließend wurden 200 µl AE-Puffer auf die Säule gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- Bei 6 000 x g und Raumtemperatur wurde für 1 min zentrifugiert
- Im Anschluss daran wurde die Säule verworfen und je 100 µl Eluat wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen.

Die aufgereinigte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

9.1.2 Aufbereitung der Gärreste und Gärsubstrate zur molekularbiologischen Untersuchung

9.1.2.1 Aufreinigung von DNA aus Rückstellproben

Die bei -80°C gelagerten Rückstellproben wurden mittels QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit der Firma Qiagen nach dem „Protokoll zur Aufreinigung von DNA aus großen Mengen Kot“ des Herstellers aufgereinigt. Bei allen Aufreinigungen wurde eine Aufreinigungskontrolle mitgeführt, bei der anstelle von Probenmaterial PBS verwendet wurde. Im folgenden Text werden die hier aufgeführten Begriffe verwendet:

- AL Puffer: Lysis Puffer
- AW1 Puffer: Waschpuffer 1
- AW2 Puffer: Waschpuffer 2
- ATE Puffer: Elutionspuffer

Die Zentrifugationsschritte wurden in einer Heraeus Fresco 17 Centrifuge (Rotor # 75003424) durchgeführt.

Aufreinigungsprotokoll:

- In 50 ml Reaktionsgefäße wurden je 10 ml InhibitEX® Buffer vorgelegt.
- Die aufgetauten Rückstellproben wurden mit einer sterilen Einmal-Impföse gut durchmischt und dann je 1 g Probe in die vorgelegten 10 ml InhibitEX® Buffer eingewogen; anschließend wurde auf dem Vortex-Mixer für 1 min gemischt.
- Im nächsten Schritt wurde 1,2 ml des Probengemisches in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß pipettiert.
- Das Gemisch wurde 5 min bei 70°C inkubiert.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde für 2 min zentrifugiert.
- 15 µl Proteinase K wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorlegt.
- Anschließend wurden 200 µl des Probenüberstandes zu der vorgelegten Proteinase K pipettiert.

- Zu dem Gemisch wurde 200 µl AL Puffer geben, anschließend wurde auf dem Vortex-Mixer gemischt.
- Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert.
- Im nächsten Schritt wurden 200 µl Ethanol absolut für die Molekularbiologie hinzu pipettiert und die Reaktionspartner gemischt.
- 600 µl des Gemisches wurden auf eine Säule gegeben.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde für 2 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Anschließend wurden 500 µl AW1 Puffer auf die Säule gegeben.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde erneut für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Im nächsten Schritt wurden 500 µl AW2 Puffer auf die Säule gegeben.
- Anschließend wurde bei 10 000 x g und Raumtemperatur für 6 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Erneut wurde bei 10 000 x g und Raumtemperatur für 6 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Abschließend wurden 200 µl ATE Puffer auf die Säule gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde für 2 min zentrifugiert.
- Am Anschluss wurde die Säule verworfen und je 100 µl Eluat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen.

Die aufgereinigte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

9.1.2.2 Aufreinigung von DNA aus TPYG-Bouillon

Die Aufreinigung der Anreicherungen in TPYG erfolgte mittels QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit der Firma Qiagen nach dem Protokoll für die „Aufreinigung von DNA aus Stuhlproben zum Nachweis von Pathogenen des Herstellers. Bei allen Aufreinigungen wurde eine Aufreinigungskontrolle mitgeführt, bei der anstelle von Probenmaterial PBS verwendet wurde. Im folgenden Text werden die hier aufgeführten Begriffe verwendet:

- AL Puffer: Lysis Puffer
- AW1 Puffer: Waschpuffer 1
- AW2 Puffer: Waschpuffer 2
- ATE Puffer: Elutionspuffer

Die Zentrifugationsschritte wurden in einer Heraeus Fresco 17 Centrifuge (Rotor # 75003424) durchgeführt.

Aufreinigungsprotokoll:

- In ein 2,0 ml Reaktionsgefäß wurden 200 µl der aufgetauten und gut durchmischten Anreicherungskultur pipettiert.
- Es wurde 1 ml InhibitEX® Puffer hinzugegeben und mittels Vortex-Mixers gemischt.
- Das Gemisch wurde 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend gemischt.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde für 2 min zentrifugiert.
- 15 µl Proteinase K wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorlegt und 200 µl des Probenüberstandes zu der vorgelegten Proteinase K pipettiert.
- Anschließend wurde 200 µl AL Puffer hinzu gegeben und das Gemisch mittels Vortex-Mixers gemischt.
- Das Gemisch wurde 10 min bei 70°C inkubiert
- Im nächsten Schritt wurden 200 µl Ethanol absolut für die Molekularbiologie hinzu gegeben und die Reaktionspartner gemischt.
- 600 µl des Gemisches wurden auf eine Säule gegeben.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde für 2 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Anschließend wurden 500 µl AW1 Puffer auf die Säule gegeben.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde erneut für 2 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Im nächsten Schritt wurden 500 µl AW2 Puffer auf die Säule geben.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde für 6 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Bei 10 000 x g und Raumtemperatur wurde nochmals für 6 min zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2,0 ml collection tube gegeben und das Filtrat verworfen.
- Im letzten Schritt wurden 200 µl ATE Puffer hinzugegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Abschließend wurde bei 10 000 x g und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert.
- Im Anschluss wurde die Säule verworfen und je 100 µl Eluat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen.

Die aufgereinigte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

9.2 Probitanalyse

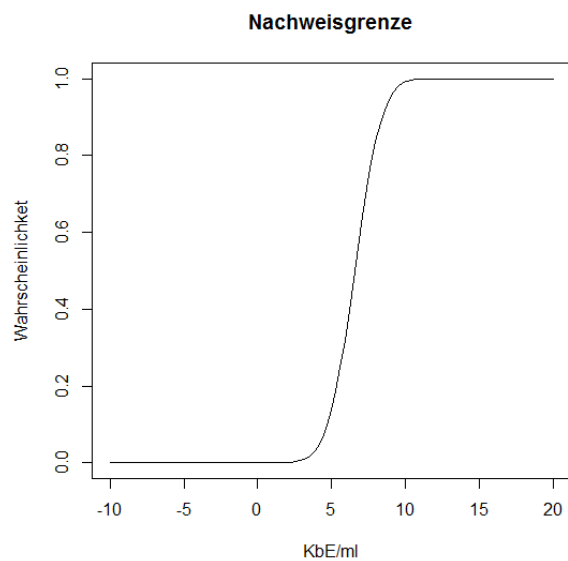


Abbildung 38: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für *Brilliance*™ Salmonella Agar bei der Verwendung von *Salmonella* Enteritidis

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 9 KbE/ml; Standardfehler = 4,32

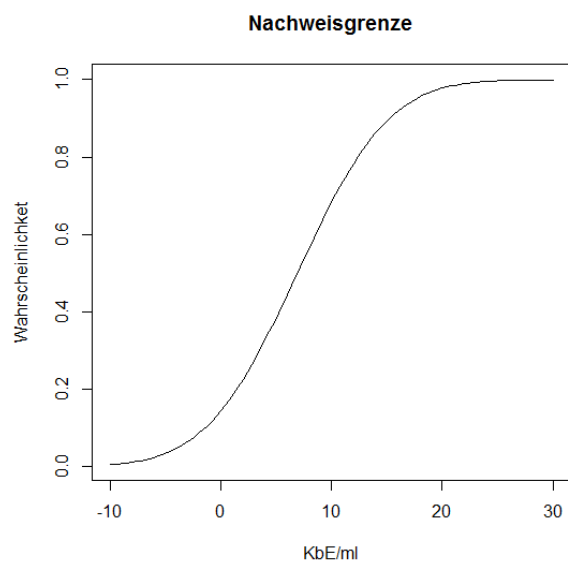


Abbildung 39: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLD Agar bei der Verwendung von *Salmonella* Enteritidis

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 18 KbE/ml; Standardfehler = 9,44

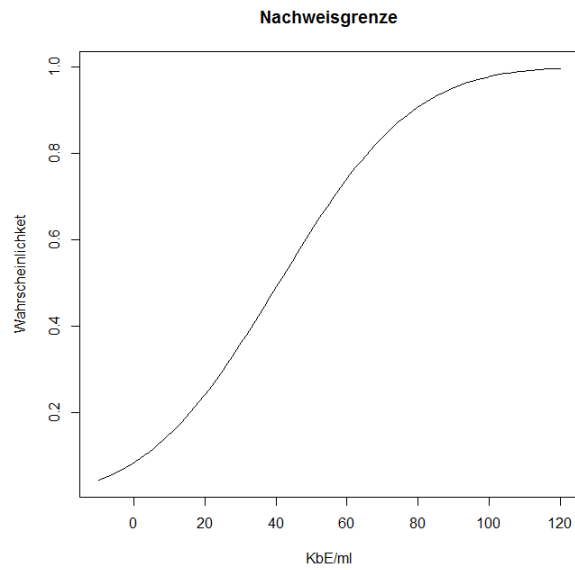


Abbildung 40: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLT4 Agar bei der Verwendung von *Salmonella Enteritidis*

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 90 KbE/ml; Standardfehler = 23,58

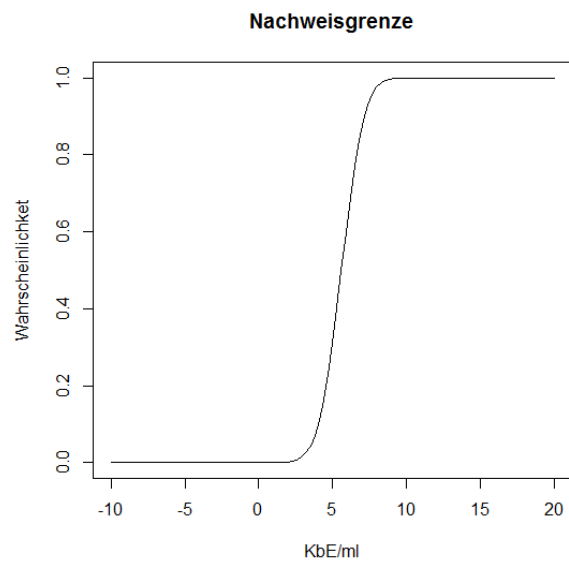


Abbildung 41: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für Brilliance™ Salmonella Agar bei der Verwendung von *Salmonella Typhimurium*

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 8 KbE/ml; Standardfehler = 1,95

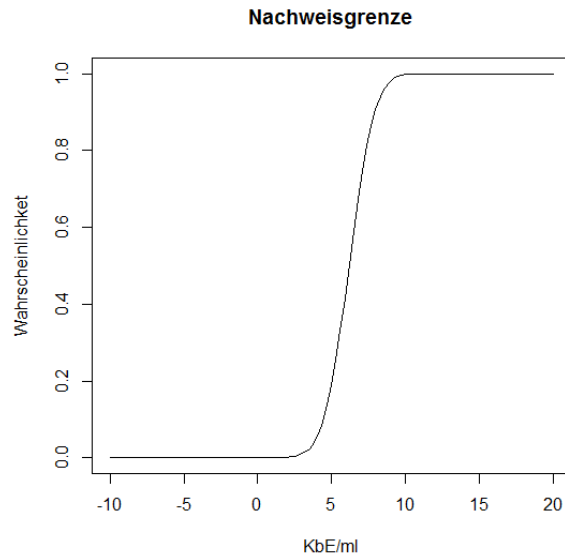


Abbildung 42: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLD Agar bei der Verwendung von *Salmonella* Typhimurium

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 8 KbE/ml; Standardfehler = 4,07

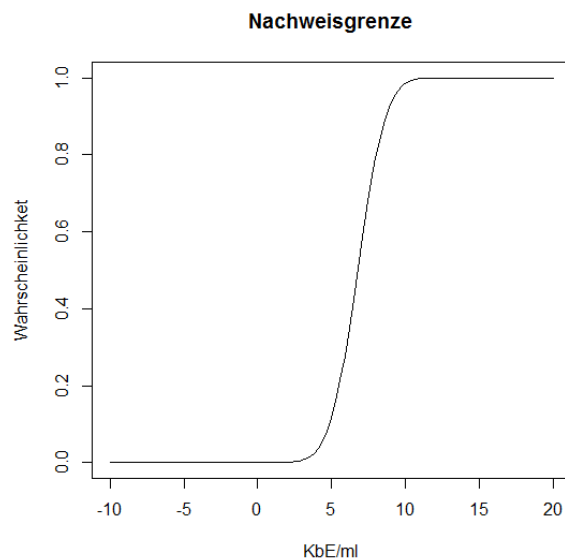


Abbildung 43: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLT4 Agar bei der Verwendung von *Salmonella* Typhimurium

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 9 KbE/ml; Standardfehler = 6,90

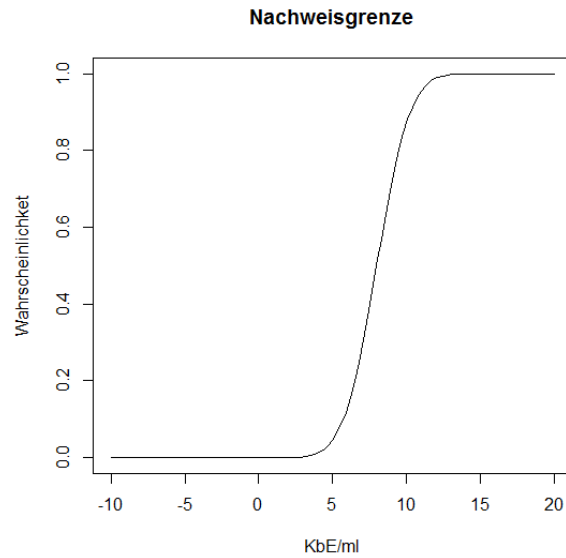


Abbildung 44: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für Enterococcus Selektivagar bei der Verwendung von *Enterococcus faecalis*

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 11 KbE/ml; Standardfehler = 18,06

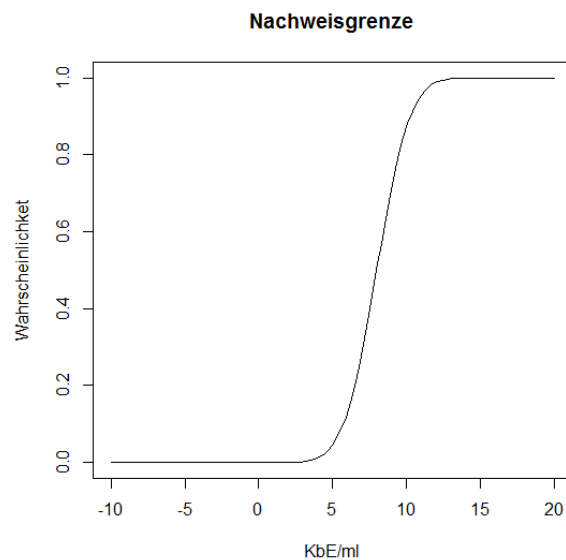


Abbildung 45: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für Slanetz Bartley Agar bei der Verwendung von *Enterococcus faecalis*

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 11 KbE/ml; Standardfehler = 18,06

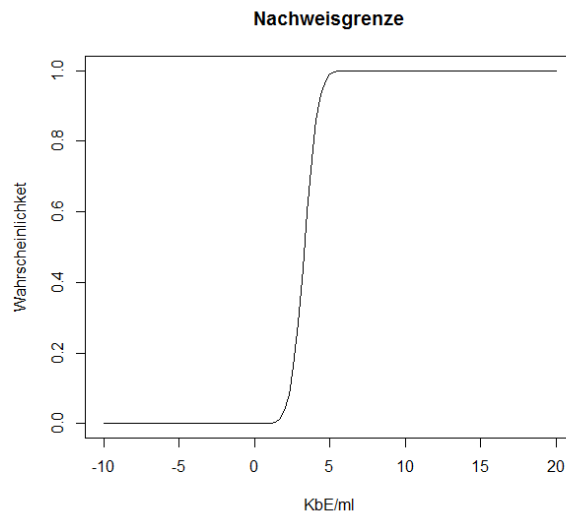


Abbildung 46: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für *Brilliance™ E. coli/Coliform* Selektiv Agar bei der Verwendung von *Escherichia coli*

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 5 KbE/ml; Standardfehler = 5,00

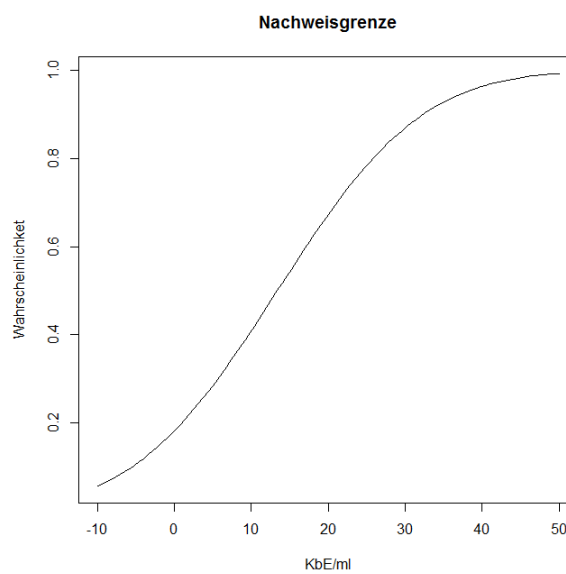


Abbildung 47: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für Tergitol 7 Lactose TTC Agar bei der Verwendung von *Escherichia coli*

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 38 KbE/ml; Standardfehler = 12,13

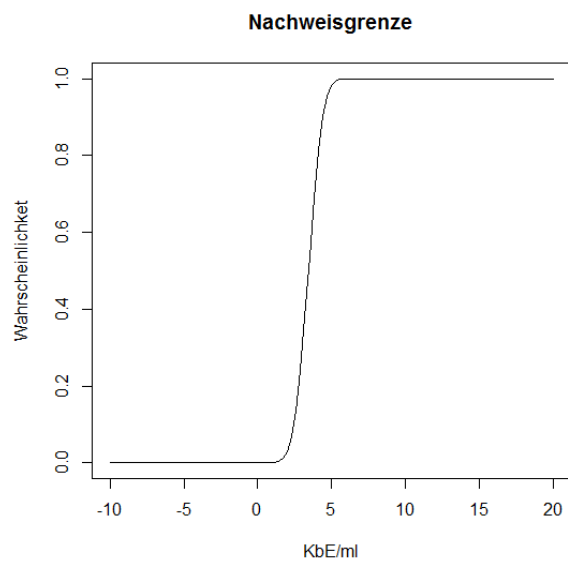


Abbildung 48: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für *Brilliance™* ESBL Agar bei der Verwendung von *Escherichia coli* 0010-73-1 (CTX-M 1)

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 5 KbE/ml; Standardfehler = 3,50

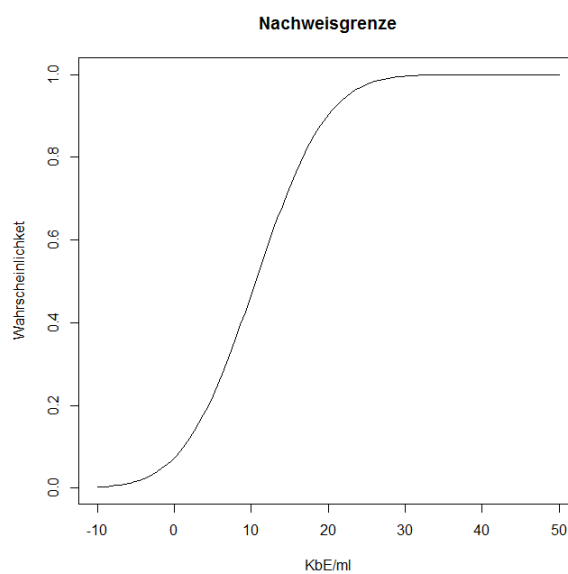


Abbildung 49: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für *Brilliance™* ESBL Agar bei der Verwendung von *Escherichia coli* 003-13-2 (CTX-M 15 TEM)

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 23 KbE/ml; Standardfehler = 27,40

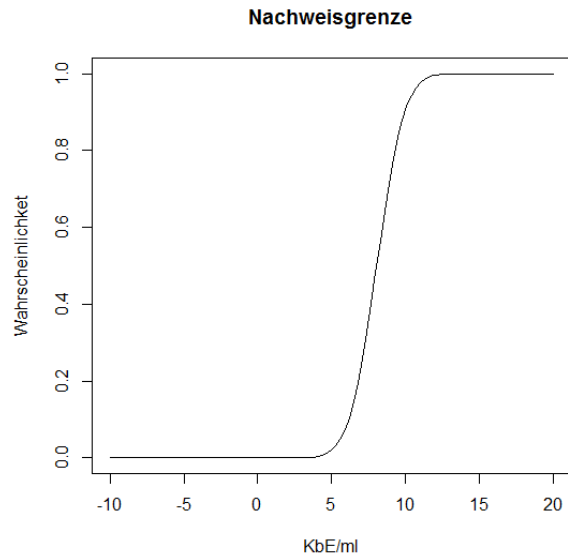


Abbildung 50: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für *Brilliance™* ESBL Agar bei der Verwendung von *Klebsiella pneumoniae* SHV-18

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 11 KbE/ml; Standardfehler = 9,34

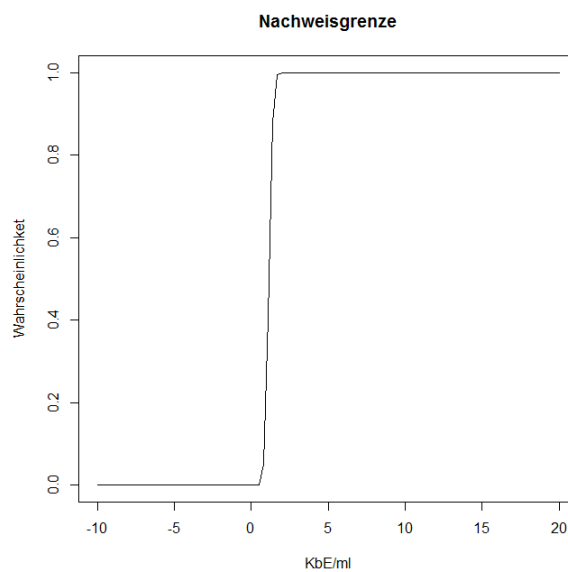


Abbildung 51: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für mCP Agar bei der Verwendung von *Clostridium perfringens*

$p = 0,95$; Nachweisgrenze = 2 KbE/ml; Standardfehler = 4,04

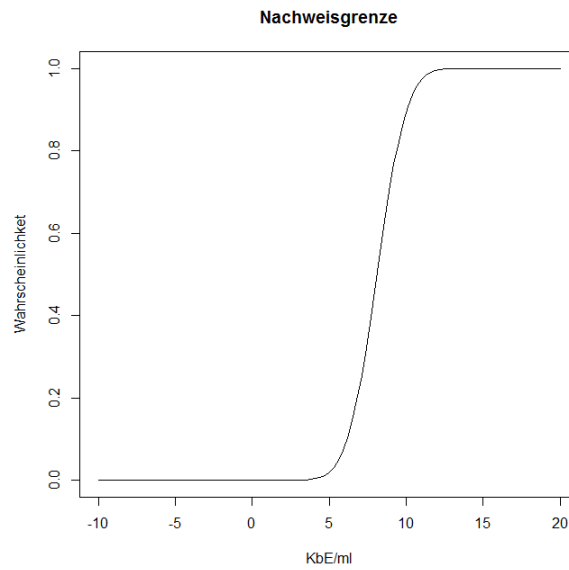


Abbildung 52: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für TSC Agar bei der Verwendung von *Clostridium perfringens*

p= 0,95; Nachweisgrenze= 11 KbE/ml; Standardfehler= 28,45

9.3

Clostridium botulinum Neurotoxin-Gen PCR

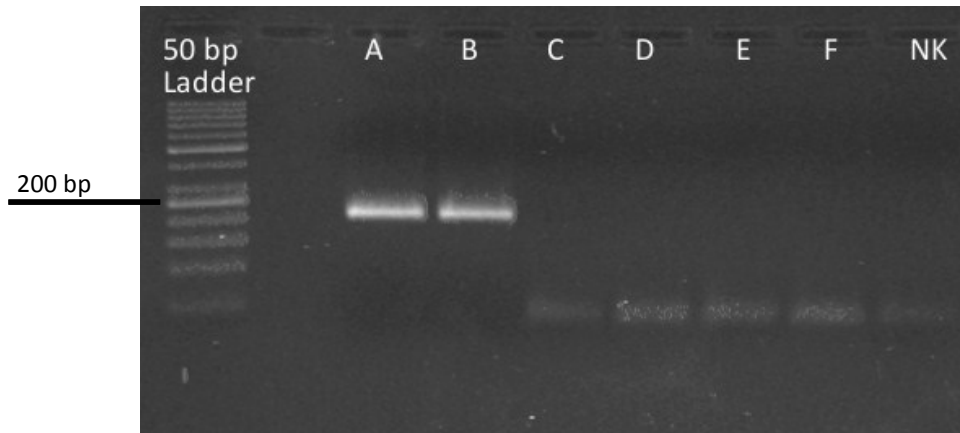


Abbildung 53: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont B* im Agarosegel (2,5%)

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); B: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931); C: *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455); D: *C. botulinum* Typ D (B-1720-01); E: *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718); F: *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281); NK: Negativkontrolle

Die *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931)-DNA und der Mastermix für *bont B* ergaben ein Amplifikationsprodukt (Bahn B) in der erwarteten Größe von 214 bp. Da *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472) ein „silent *bont B*“ besitzt ist hier ebenfalls eine Bande in der erwarteten Höhe zu erkennen. Die DNA der anderen *C. botulinum* BoNT-Typen ergaben kein Amplifikationsprodukt (Bahn C-F). Im Agarosegel sind darüber hinaus auf der Höhe der 50 bp-Bande Primer-Dimere zu erkennen.

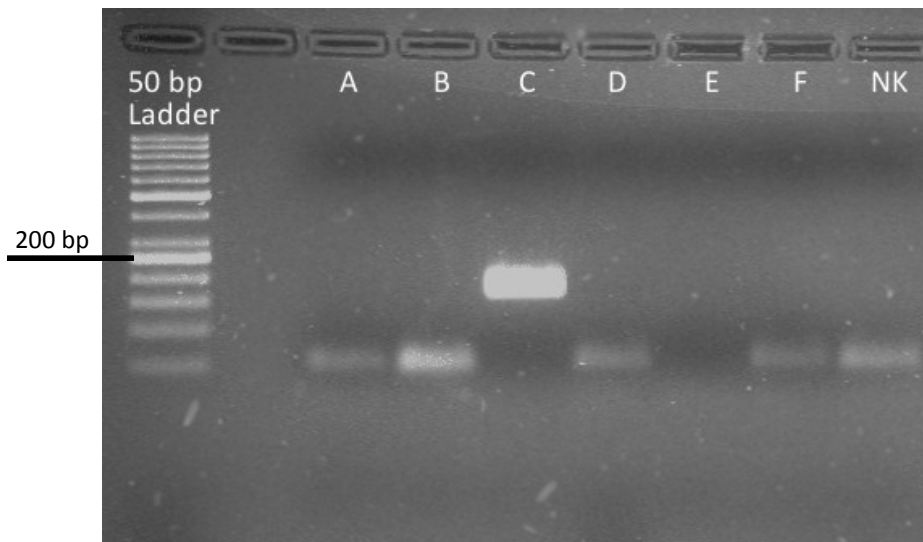


Abbildung 54: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont C* im Agarosegel (2,5%)

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); B: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931); C: *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455); D: *C. botulinum* Typ D (B-1720-01); E: *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718); F: *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281); NK: Negativkontrolle

Die *C. botulinum* Typ C-DNA und der Mastermix für *bont C* ergaben ein Amplifikationsprodukt (Bahn C) in der erwarteten Größe von 181 bp. Die DNA der anderen *C. botulinum* BoNT-Typen ergaben kein Amplifikationsprodukt (Bahn A-B und D-F). Im Agarosegel sind darüber hinaus auf der Höhe der 50 bp-Bande der Ladder Primer-Dimere zu erkennen.

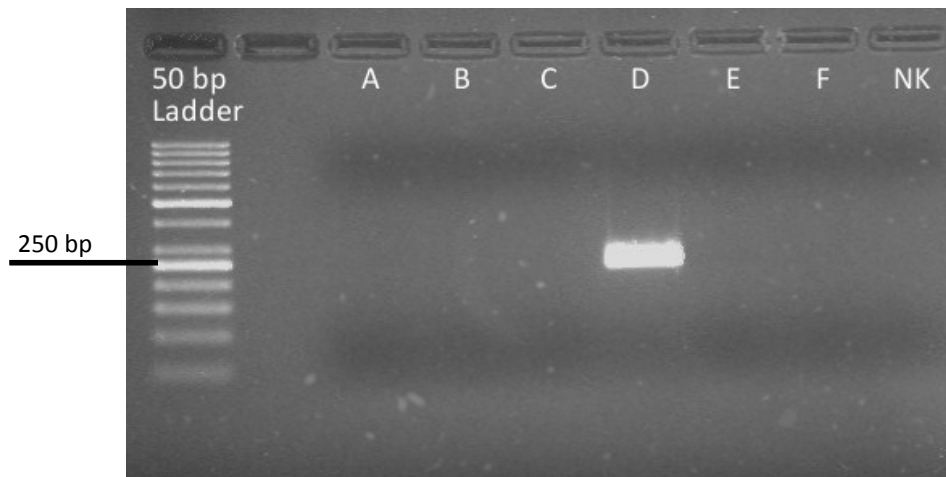


Abbildung 55: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont D* im Agarosegel (2,5%)

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); B: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931); C: *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455); D: *C. botulinum* Typ D (B-1720-01); E: *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718); F: *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281); NK: Negativkontrolle

Die *C. botulinum* Typ D-DNA und der Mastermix für *bont D* ergaben ein Amplifikationsprodukt (Bahn D) in der erwarteten Größe von 250 bp. Die DNA der anderen *C. botulinum* BoNT-Typen ergaben kein Amplifikationsprodukt (Bahn A-C und E-F). Im Agarosegel sind darüber hinaus auf der Höhe der 50 bp-Bande der Ladder Primer-Dimere zu erkennen.

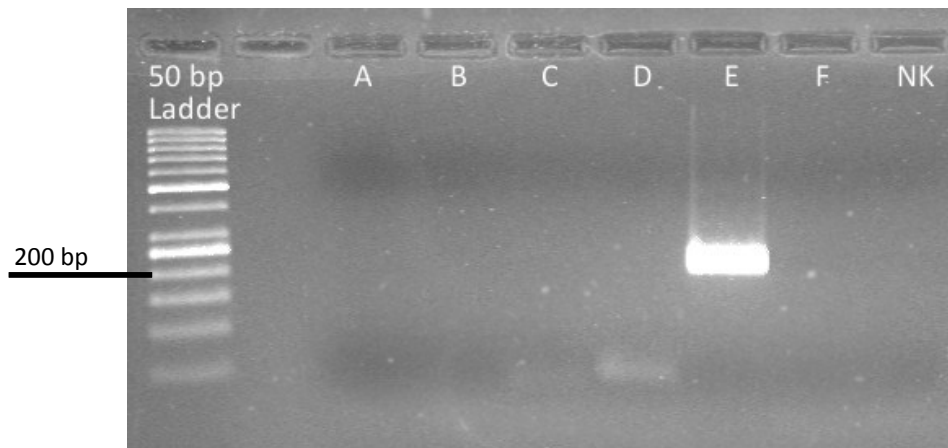


Abbildung 56: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont E* im Agarosegel (2,5%)

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); B: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931); C: *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455); D: *C. botulinum* Typ D (B-1720-01); E: *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718); F: *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281); NK: Negativkontrolle

Die *C. botulinum* Typ E-DNA und der Mastermix für *bont E* ergaben ein Amplifikationsprodukt (Bahn E) in der erwarteten Größe von 230 bp. Die DNA der anderen *C. botulinum* BoNT-Typen ergaben kein Amplifikationsprodukt (Bahn A-D und F). Im Agarosegel sind darüber hinaus auf der Höhe der 50 bp-Bande der Ladder Primer-Dimere zu erkennen.

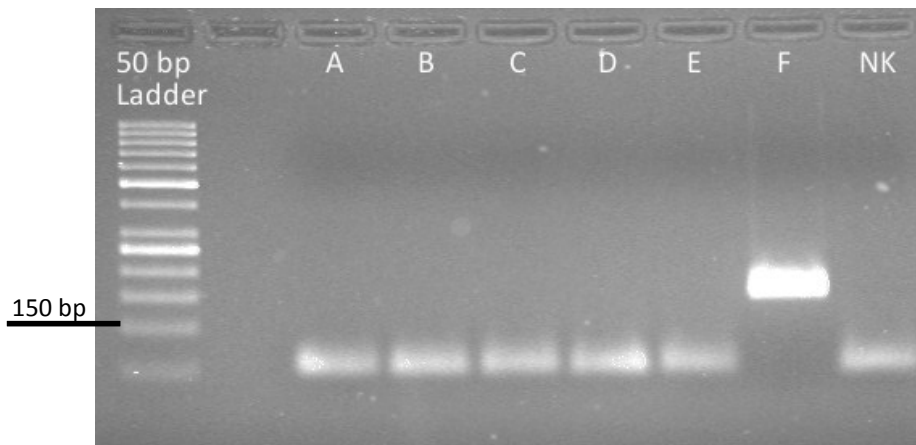


Abbildung 57: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont F* im Agarosegel (2,5%)

A: *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); B: *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931); C: *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455); D: *C. botulinum* Typ D (B-1720-01); E: *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718); F: *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281); NK: Negativkontrolle

Die *C. botulinum* Typ F-DNA und der Mastermix für *bont F* ergaben ein Amplifikationsprodukt (Bahn F) in der erwarteten Größe von 158 bp. Die DNA der anderen *C. botulinum* BoNT-Typen ergaben kein Amplifikationsprodukt (Bahn A-E). Im Agarosegel sind darüber hinaus auf der Höhe der 50 bp-Bande der Ladder Primer-Dimere zu erkennen.

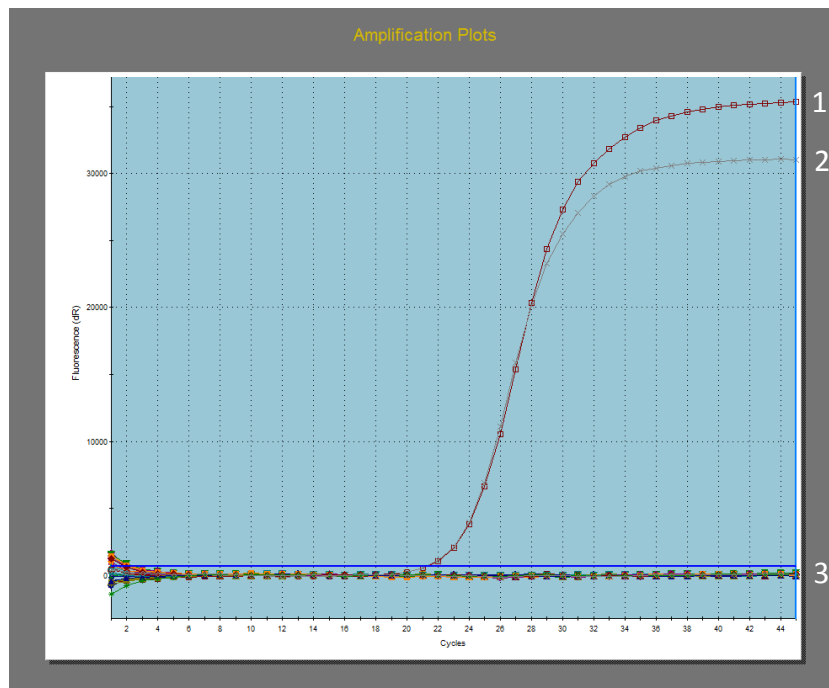


Abbildung 58: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont A* und *bont B*

1: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ A mit *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472) DNA; 2: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ B mit *C. botulinum* Typ B (BC 36/06, REB 1931) DNA; 3: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ A und Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ B mit *C. perfringens* Typ A (DSM 756); *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); *C. novyi* (REN 773); *C. sordellii* (Feldisolat); *C. bifermentas* (Feldisolat); *C. subterminale* (Feldisolat); *C. sporogenes* (Feldisolat); *C. butyricum* (Feldisolat); *C. difficile* (Feldisolat); Negativkontrolle

Der Mastermix zur Detektion von *bont A* erbrachte ein Signal für die DNA von *C. botulinum* Typ A (1), der Mastermix zu Detektion von *bont B* erbrachte ein Signal für die DNA von *C. botulinum* Typ B (2). Die DNA von anderen Clostridien führte mit keinem der Mastermixe zu einem Amplifikationssignal (3).

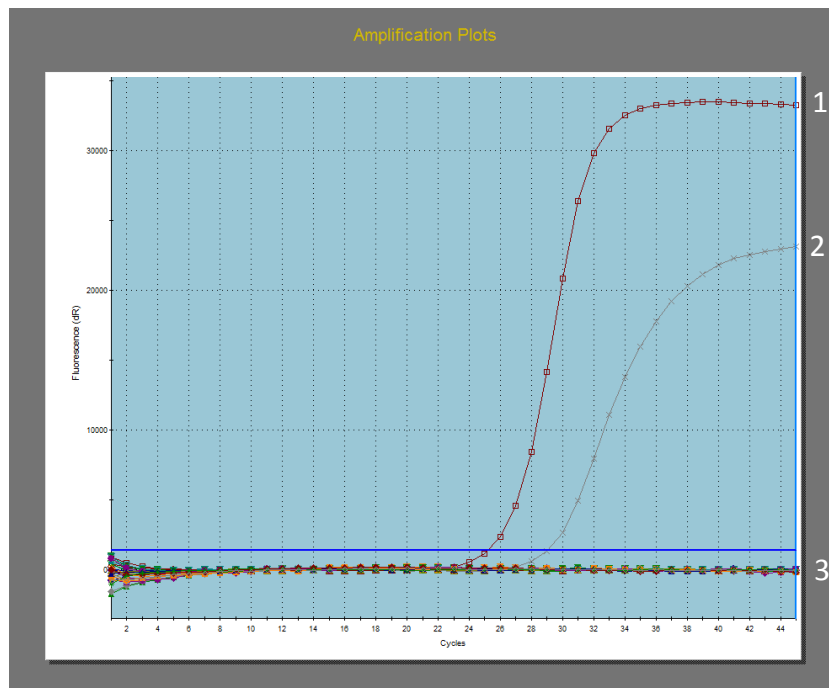


Abbildung 59: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont C* und *bont D*

1: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ C mit *C. botulinum* Typ C (S0028/10, REB 1455) DNA; 2: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ D mit *C. botulinum* Typ D (B-1720-01) DNA; 3: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ C und Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ D mit *C. perfringens* Typ A (DSM 756); *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); *C. novyi* (REN 773); *C. sordellii* (Feldisolat); *C. bifermentas* (Feldisolat); *C. subterminale* (Feldisolat); *C. sporogenes* (Feldisolat); *C. butyricum* (Feldisolat); *C. difficile* (Feldisolat); Negativkontrolle

Der Mastermix zur Detektion von *bont C* erbrachte ein Signal für die DNA von *C. botulinum* Typ C (1), der Mastermix zu Detektion von *bont D* erbrachte ein Signal für die DNA von *C. botulinum* Typ D (2). Die DNA von anderen Clostridien führte mit keinem der Mastermixe zu einem Amplifikationssignal (3).

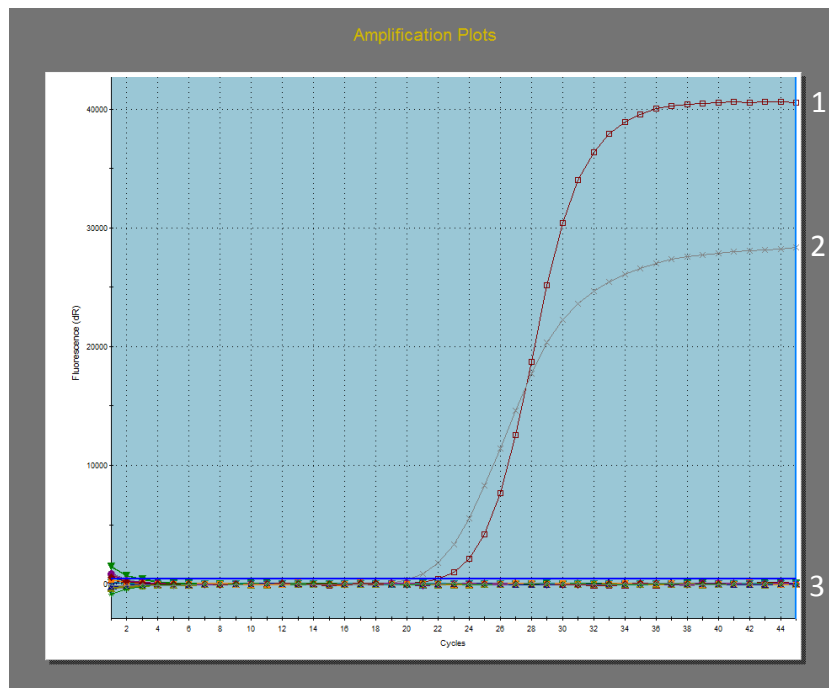


Abbildung 60: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von *bont C* und *bont D*

1: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ E mit *C. botulinum* Typ E (S0187/09, REB 1718) DNA; 2: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ F mit *C. botulinum* Typ F (BC 69/06, NCTC 10281) DNA; 3: Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ E und Mastermix zur Detektion von *C. botulinum* Typ F mit *C. perfringens* Typ A (DSM 756); *C. perfringens* Typ B (ATCC 3626); *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180); *C. perfringens* Typ D (ATCC 12917); *C. perfringens* Typ E (ATCC 27324); *C. novyi* (REN 773); *C. sordellii* (Feldisolat); *C. bifermentas* (Feldisolat); *C. subterminale* (Feldisolat); *C. sporogenes* (Feldisolat); *C. butyricum* (Feldisolat); *C. difficile* (Feldisolat); Negativkontrolle

Der Mastermix zur Detektion von *bont E* erbrachte ein Signal für die DNA von *C. botulinum* Typ E (1), der Mastermix zu Detektion von *bont F* erbrachte ein Signal für die DNA von *C. botulinum* Typ F (2). Die DNA von anderen Clostridien führte mit keinem der Mastermixe zu einem Amplifikationssignal (3).

9.4 *Clostridium botulinum* NTNH-Gen PCR

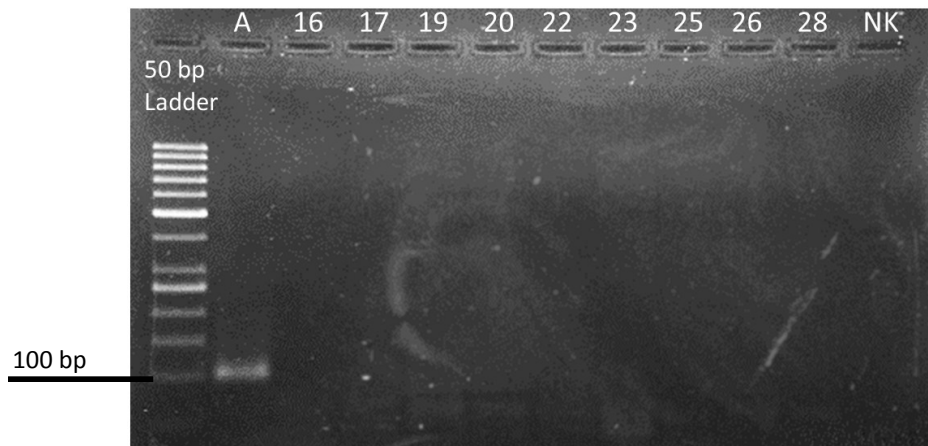


Abbildung 61: Auswertung der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)

A: Referenzstamm *C. botulinum* Typ A (S0174/09 (REB 1472)); 16: Anreicherung von GEL-16-AN; 17: Anreicherung von GEL-17-AN, 19: Anreicherung von 1-19-AN; 20: Anreicherung von 1-20-AN; 22: Anreicherung von 2-22-AN; 23: Anreicherung von 2-23-AN; 25: Anreicherung von 3-25-AN; 26: Anreicherung von 3-26-AN; 28: Anreicherung von JF-28-AN; NK: Negativkontrolle

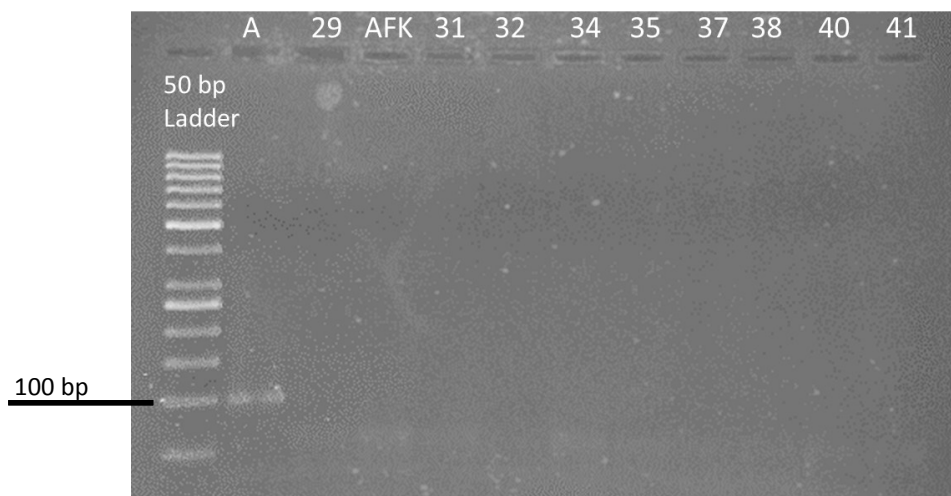


Abbildung 62: Auswertung der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)

A: Referenzstamm *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); 29: Anreicherung von JF-29-AN; AFK: Kontrolle der DNA Aufreinigung; 31: Anreicherung von JNG-31-AN; 32: Anreicherung von JNG-32-AN; 34: Anreicherung von JEL1-34-AN; 35: Anreicherung von JEL1-35-AN; 37: Anreicherung von JEL2-37-AN; 38: Anreicherung von JEL2-38-AN; 40: Anreicherung von EVG-40-AN; 41: Anreicherung von EVG-41-AN

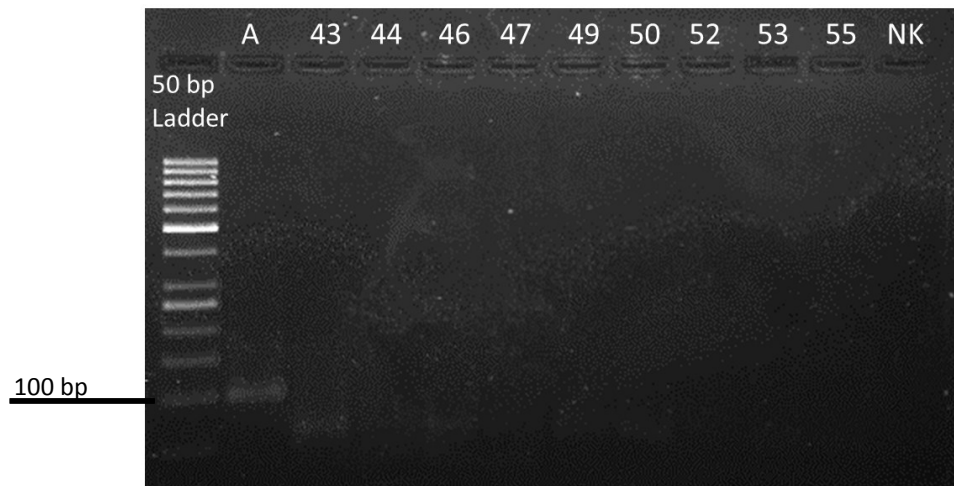


Abbildung 63: Auswertung der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)

A: Referenzstamm *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); 43: Anreicherung von EF-43-AN; 44: Anreicherung von EF-44-AN; 46: Anreicherung von ENG-46-AN; 47: Anreicherung von ENG-47-AN; 49: Anreicherung von EL-49-AN; 50: Anreicherung von EL-50-AN; 52: Anreicherung von AH1-52-AN; 53: Anreicherung von AH1-53-AN; 55: AH2-55-AN; NK: Negativkontrolle

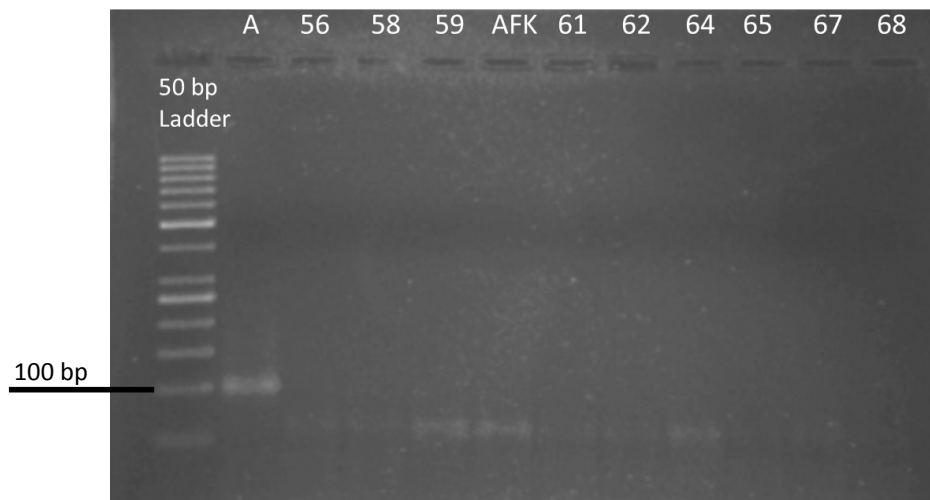


Abbildung 64: Auswertung der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)

A: Referenzstamm *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); 56: Anreicherung von AH2-56-AN; 58: Anreicherung von AF-58-AN; 59: Anreicherung von AF-59-AN; AFK: Kontrolle der DNA Aufreinigung; 61: Anreicherung von ANG-61-AN; 62: Anreicherung von ANG-62-AN; 64: Anreicherung von BH-64-AN; 65: Anreicherung von BH-65-AN; 67: Anreicherung von BF-67-AN; 68: Anreicherung von BF-68-AN

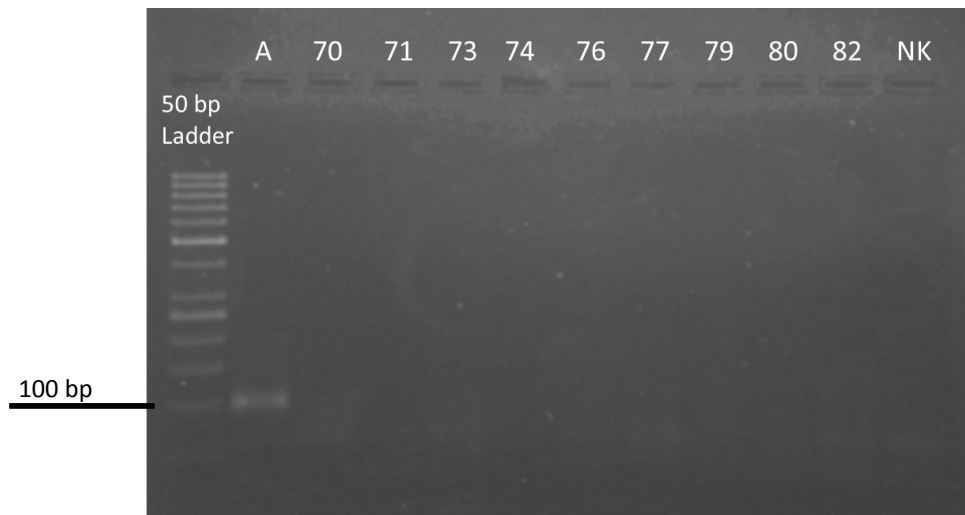


Abbildung 65: Auswertung der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)

A: Referenzstamm *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); 70: Anreicherung von AH-70-AN; 71: Anreicherung von AH-71-AN; 73: BH-73-AN; 74: Anreicherung von BH-74-AN; 76: CH-76-AN; 77: Anreicherung von CH-77-AN; 79: Anreicherung von GVG-79-AN; 80: Anreicherung von GVG-80-AN; 82: Anreicherung von GF-82-AN; NK: Negativkontrolle

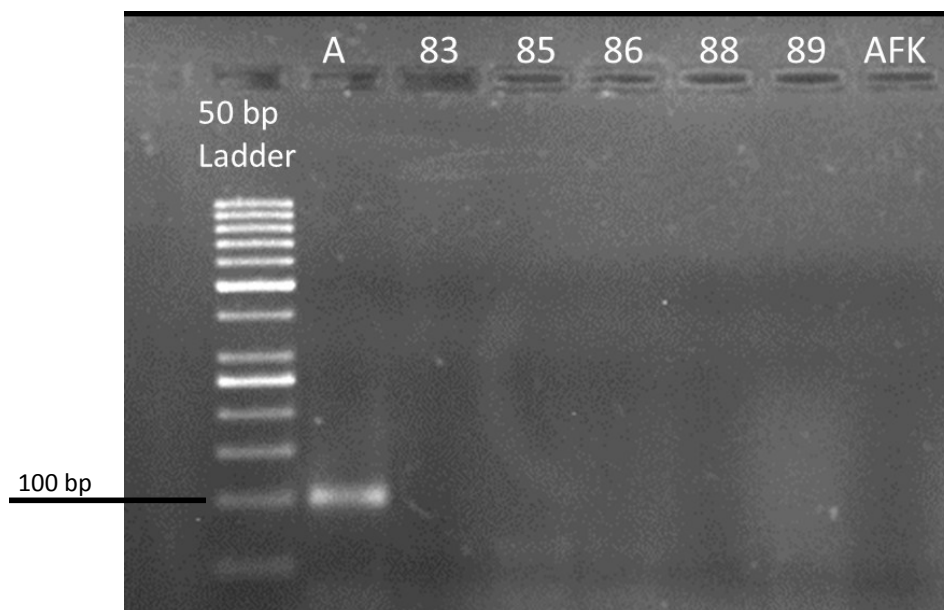


Abbildung 66: Auswertung der *C. botulinum* NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)

A: Referenzstamm *C. botulinum* Typ A (S0174/09, REB 1472); 83: Anreicherung von GF-83-AN; 85: Anreicherung von GF2-85-AN; 86: Anreicherung von GF2-86-AN; 88: Anreicherung von GNG-88-AN; 89: Anreicherung von GNG-89-AN; AFK: Kontrolle der DNA Aufreinigung

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorauswahl der Nährmedien für die Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten	32
Tabelle 2: Probenentnahmestellen in den Pilotbetrieben	36
Tabelle 3: Spezifische Oligonukleotid-Primer für die PCR nach Van Asten et al. (2009)	40
Tabelle 4: Mastermix für die <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR	41
Tabelle 5: Positivkontrollen für die <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR	41
Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Profil der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR	42
Tabelle 7: Touch-down Protokoll für die <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR	42
Tabelle 8: Spezifische Oligonukleotid-Primer für die <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR	43
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR	44
Tabelle 10: Temperatur-Zeit-Profil der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR	44
Tabelle 11: Spezifische Oligonukleotid-Primer und Sonden der <i>C. botulinum</i> Neurotoxin-Gen real-time PCR	45
Tabelle 12: Mastermix für <i>bont A – E</i> und <i>G</i>	46
Tabelle 13: Mastermix für <i>bont F</i>	46
Tabelle 14: Positivkontrollen für die real-time <i>C. botulinum</i> Neurotoxin-Gen PCR	46
Tabelle 15: Temperatur-Zeit-Profil <i>C. botulinum</i> Neurotoxin-Gen PCR	47
Tabelle 16: Agarosegel für die <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR	48
Tabelle 17: Agarosegel für die <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR	48
Tabelle 18: Nachweis von Bakterien aus beimpfter Matrix – Bestimmung der Nachweisgrenze für verschiedene Nährböden	56
Tabelle 19: Erwartete Amplifikatgrößen der Positivkontrollen für die <i>C. perfringens</i> PCR	58
Tabelle 20: Ergebnisse der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR	60
Tabelle 21: Ergebnisübersicht der <i>C. botulinum bont</i> -real-time PCR	62
Tabelle 22: Auswertung der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR	76
Tabelle 23: Auswertung der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR mit DNA aus TPYG-Bouillon	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der anaeroben Fermentation.....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Biogasanlage mit Probenentnahmestellen.....	36
Abbildung 2: <i>C. botulinum</i> Typ B (BC 36/06, REB 1931) auf Eigelb Laktose Agar	51
Abbildung 4: <i>Salmonella</i> auf <i>Brilliance</i> [™] Salmonella Agar	51
Abbildung 5: <i>Salmonella</i> auf XLT4 Agar	52
Abbildung 6: <i>Salmonella</i> auf XLD Agar	52
Abbildung 7: <i>Enterococcus faecalis</i> auf Slanetz Bartley Agar und Enterococcus Selektivagar	53
Abbildung 8: <i>Escherichia coli</i> auf <i>Brilliance</i> [™] E. coli/Coliform Selektiv Agar (rechts) und Tergitol 7 Lactose TTC Agar (links).....	53
Abbildung 9: <i>E. coli</i> 0010-73-1 (links) und <i>E. coli</i> 003-13-2 (rechts) auf <i>Brilliance</i> [™] ESBL Agar	54
Abbildung 10: <i>K. pneumoniae</i> SHV-18 auf <i>Brilliance</i> [™] ESBL Agar.....	54
Abbildung 11: <i>C. perfringens</i> (Feldisolat) auf TSC Agar.....	55
Abbildung 12: Ergebnis der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR mit den Positivkontrollen; Auswertung im Agarosegel (3%).....	58
Abbildung 13: Ergebnis der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR mit den Positivkontrollen; Auswertung im Agarosegel (2,5%)	59
Abbildung 14: Ergebnis der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR mit verschiedenen Clostridienstämmen; Auswertung im Agarosegel (2,5%).....	60
Abbildung 15: Auswertung der real-time PCR zur Neurotoxin-Typ Bestimmung von <i>C.</i> <i>botulinum</i>	61
Abbildung 16: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont A</i> im Agarosegel (2,5%)	62
Abbildung 17: Gärrest auf <i>Brilliance</i> [™] Salmonella Agar	63
Abbildung 18: Native Feldprobe 1:10 verdünnt auf Enterococcus Selektivagar (links) und Slanetz Bartley Agar (rechts)	64
Abbildung 19: Feldprobe auf <i>Brilliance</i> [™] E. coli/Coliform Selektiv Agar	64
Abbildung 20: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 2	66
Abbildung 21: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 3	67
Abbildung 22: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 4	68
Abbildung 23: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 5	69
Abbildung 24: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 6	70
Abbildung 25: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 7	71
Abbildung 26: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 8	72
Abbildung 27: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 9a	73
Abbildung 28: Ergebnisse der Identifizierung ESBL-bildender <i>Enterobacteriaceae</i> für PB 9a... 73	

Abbildung 29: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 9b	74
Abbildung 30: Ergebnisse der Identifizierung ESBL-bildender <i>Enterobacteriaceae</i> für PB 9b ..	75
Abbildung 31: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung für PB 10	76
Abbildung 32: Auswertung der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR mit Feldisolaten im Agarosegel (3%)	78
Abbildung 33: Auswertung der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR mit Feldisolaten im Agarosegel (3%)	79
Abbildung 34: Auswertung der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR mit DNA aus nativem Gärrest und Gärsubstraten im Agarosegel (3%)	80
Abbildung 35: Auswertung der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen touch-down PCR im Agarosegel (3%)	81
Abbildung 36: Auswertung der <i>C. perfringens</i> Toxin-Gen PCR mit DNA aus TPYG-Bouillon (Agarosegel 3%)	82
Abbildung 37: Auswertung der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)	84
Abbildung 38: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für <i>Brilliance</i> [™] Salmonella Agar bei der Verwendung von <i>Salmonella</i> Enteritidis	116
Abbildung 39: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLD Agar bei der Verwendung von <i>Salmonella</i> Enteritidis	116
Abbildung 40: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLT4 Agar bei der Verwendung von <i>Salmonella</i> Enteritidis	117
Abbildung 41: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für <i>Brilliance</i> [™] Salmonella Agar bei der Verwendung von <i>Salmonella</i> Typhimurium	117
Abbildung 42: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLD Agar bei der Verwendung von <i>Salmonella</i> Typhimurium	118
Abbildung 43: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für XLT4 Agar bei der Verwendung von <i>Salmonella</i> Typhimurium	118
Abbildung 44: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für Enterococcus Selektivagar bei der Verwendung von <i>Enterococcus faecalis</i>	119
Abbildung 45: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für Slanetz Bartley Agar bei der Verwendung von <i>Enterococcus faecalis</i>	119
Abbildung 46: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für <i>Brilliance</i> [™] E. coli/Coliform Selektiv Agar bei der Verwendung von <i>Escherichia coli</i>	120
Abbildung 47: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für Tergitol 7 Lactose TTC Agar bei der Verwendung von <i>Escherichia coli</i>	120
Abbildung 48: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für <i>Brilliance</i> [™] ESBL Agar bei der Verwendung von <i>Escherichia coli</i> 0010-73-1 (CTX-M 1)	121
Abbildung 49: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für <i>Brilliance</i> [™] ESBL Agar bei der Verwendung von <i>Escherichia coli</i> 003-13-2 (CTX-M 15 TEM)....	121

Abbildung 50: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für <i>Brilliance™</i> ESBL Agar bei der Verwendung von <i>Klebsiella pneumoniae</i> SHV-18.....	122
Abbildung 51: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für mCP Agar bei der Verwendung von <i>Clostridium perfringens</i>	122
Abbildung 52: Grafische Darstellung der ermittelten Nachweisgrenze für TSC Agar bei der Verwendung von <i>Clostridium perfringens</i>	123
Abbildung 53: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont B</i> im Agarosegel (2,5%)	124
Abbildung 54: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont C</i> im Agarosegel (2,5%)	125
Abbildung 55: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont D</i> im Agarosegel (2,5%)	126
Abbildung 56: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont E</i> im Agarosegel (2,5%)	127
Abbildung 57: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont F</i> im Agarosegel (2,5%)	128
Abbildung 58: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont A</i> und <i>bont B</i>	129
Abbildung 59: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont C</i> und <i>bont D</i>	130
Abbildung 60: Auswertung der real-time PCR mit dem Mastermix zur Detektion von <i>bont C</i> und <i>bont D</i>	131
Abbildung 61: Auswertung der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)	132
Abbildung 62: Auswertung der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)	132
Abbildung 63: Auswertung der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)	133
Abbildung 64: Auswertung der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)	133
Abbildung 65: Auswertung der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)	134
Abbildung 66: Auswertung der <i>C. botulinum</i> NTNH-Gen PCR im Agarosegel (2,5%)	134

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die an der Erstellung meiner Doktorarbeit in direkter oder indirekter Form beteiligt waren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung und Überlassung des Themas sowie für die wissenschaftliche Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch beim Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie für die Ausschreibung des Projektes, das mir meine Promotion ermöglicht und finanziert hat.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Stephanie Speck für die wissenschaftliche Betreuung und tatkräftige Hilfe sowie die konstruktive Unterstützung bei allen auftretenden Fragen und der Verfassung meiner Dissertation.

Vielen lieben Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen für ihre Hilfe und Unterstützung, das kollegiale Miteinander und die Aufmunterungen.

Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. med. Philipp Kayßer für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse mittels Probitanalyse.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Marc, für die eifrige Probenahme, die fachlichen Gespräche, die ausführlichen Erklärungen zu allen Fragen bezüglich Biogasanlagen, die ich während des Projektes gestellt habe und für seine Unterstützung und den Rückhalt, den er mir gegeben hat.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung, die ich von ihnen erhalten habe, bevor ich überhaupt angefangen habe zu studieren und auch während des Studiums sowie der Promotion.